

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE L-ISOASPARTATE MÉTHYLTRANSFÉRASE
DANS LES GLIOBLASTOMES HUMAINS EST DÉPENDANTE DE LA KINASE mTOR

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
IRVENS FANÉLUS

Mai 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article **11** du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr Richard Desrosiers, pour son dévouement scientifique, son soutien et son discernement qui ont été une source de motivation tout au long de ma maîtrise.

Je remercie de plus le Dr Julie Lanthier et tous mes collègues de laboratoire pour le support technique et les conseils judicieux.

Je tiens aussi à remercier ma famille, particulièrement ma mère, Marie Anne, pour m'avoir soutenu et encouragé durant mes études. Enfin, je remercie ma copine Sherny pour sa présence et sa compréhension.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vi
RÉSUMÉ.....	viii

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase.....	1
1.1.1 Les propriétés de la PIMT.....	3
1.1.2 Le mécanisme de réparation des protéines par la PIMT.....	4
1.2 La PIMT et l'étude de son rôle biologique.....	5
1.2.1 Le rôle de la PIMT dans les désordres neurologiques.....	5
1.2.2 La PIMT, une nouvelle cible de la protéine mTOR.....	6
1.3 mTOR.....	7
1.3.1 La structure et les fonctions de mTOR.....	7
1.3.2 Les voies de signalisation de mTOR.....	9
1.4 mTOR, une nouvelle cible de la thérapie anticancéreuse.....	11
1.5 Objectifs.....	13

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel.....	14
2.2 Méthodes.....	14
2.2.1 Culture cellulaire.....	14
2.2.2 Traitements avec les inhibiteurs pharmacologiques.....	15
2.2.3 Transfection des cellules avec un siRNA contre mTOR.....	15
2.2.4 Lyse cellulaire.....	15
2.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert.....	16

2.2.6 Immunodétection des protéines par buvardage Western.....	16
2.2.7 Isolement de l'ARN.....	17
2.2.8 RT-PCR.....	17
2.2.9 Analyses statistiques.....	18

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 La rapamycine inhibe l'expression de la PIMT.....	19
3.2 La diminution de l'expression de la PIMT n'est pas due à une inhibition de sa transcription génétique ou à une instabilité de l'ARNm.....	20
3.3 Effet des immunosuppresseurs sur l'expression de la PIMT.....	20
3.4 Effet de la privation en glutamine sur l'expression de la PIMT.....	21
3.5 Effet de l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR sur l'expression de la PIMT.....	21
3.6 Effet des inhibiteurs des voies des MAP kinases sur l'expression de la PIMT.....	23
3.7 L'inhibition de l'expression de mTOR par siRNA entraîne une diminution de l'expression de la PIMT.....	24

CHAPITRE IV

DISCUSSION.....	35
CONCLUSION.....	43
BIBLIOGRAPHIE.....	44

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Réaction enzymatique de méthylation par la PIMT.....	2
Figure 1.2	Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT.....	4
Figure 1.3	Représentation des domaines de la structure primaire de mTOR.....	8
Figure 1.4	Voies de signalisation de mTOR.....	11
Figure 3.1	La rapamycine inhibe l'expression de la PIMT.....	25
Figure 3.2	La diminution de l'expression de la PIMT n'est pas due à une inhibition de sa transcription génétique ou à une instabilité de l'ARNm.....	26
Figure 3.3	L'effet des immunosuppresseurs sur l'expression de la PIMT.....	27
Figure 3.4	L'effet de la privation en glutamine sur l'expression de la PIMT.....	28
Figure 3.5	Effet de la wortmannin sur l'expression de la PIMT.....	29
Figure 3.6	Effet du LY294002 sur l'expression de la PIMT.....	30
Figure 3.7	Effet du LY303511 sur l'expression de la PIMT.....	31
Figure 3.8	Effet de l'inhibiteur d'AKT sur l'expression de la PIMT.....	32
Figure 3.9	Effet des inhibiteurs des voies des MAP kinases sur l'expression de la PIMT.....	33
Figure 3.10	L'inhibition de l'expression de mTOR par siRNA entraîne une chute de l'expression de la PIMT.....	34
Figure 4.1	Schéma des voies de signalisation étudiées pour l'analyse des mécanismes de régulation de la PIMT.....	42

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AdoMet	S-adénosyl-L-méthionine
AdoHcy	S-adénosyl-L-homocystéine
ADN	Acide désoxyribonucléique
APS	Persulfate d'ammonium
AMPK	<i>Adenosine monophosphate-dependent protein kinase</i>
AKT	Homologue cellulaire du <i>acutely transforming retrovirus AKT8 in rodent T cell lymphoma</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin
CHAPS	3-[3-cholamidopropyl]-diméthylamino]-1-propanesulfonate
CK2	Caséine kinase 2
CsA	Cyclosporine A
Da	dalton
4E-BP1	<i>Eukaryotic initiation factor 4E binding protein</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic initiation factor-4E</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
FKBP-12	<i>FK-506 binding protein-12</i>
GβL	<i>G protein β-subunit-like protein</i>
GTP	Guanosine triphosphate
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KDa	kilodalton
3-MA	3-méthyladénine
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Pb	Paire de base
PBS	Tampon phosphate salin
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PDVF	difluorure de Polyvinylidène
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIMT	Protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten</i>
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
RAPA	Rapamycin
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
S6K1	p70S6 kinase
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
siRNA	<i>Short interfering ribonucleic acid</i>

SV	Sérum de veau
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
TBS	Tampon tris salin
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

RÉSUMÉ

La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase (PIMT) est une enzyme de réparation qui cible les protéines endommagées par l'accumulation de résidus L-isoaspartates anormaux. Les voies de signalisation qui contrôlent l'expression de la PIMT sont peu connues. D'autre part, la kinase mTOR est une protéine centrale pour les cellules. Elle contrôle la synthèse des protéines, le cycle cellulaire et l'intégration des voies de signalisation régulées par des facteurs de croissance et des nutriments. Or, nous démontrons dans cette étude que l'expression de la PIMT est dépendante de mTOR. En utilisant des analyses par immunobuvardage de type Western et RT-PCR, nous montrons qu'une concentration physiologique (0.02 μ M) et élevée (1 μ M) de l'inhibiteur spécifique de mTOR, la rapamycine, inhibe (40% et 70%) l'expression de la PIMT sans modulation du niveau d'ARNm. D'un autre côté, l'expression de la PIMT diminue lorsqu'on prive les cellules en glutamine, une condition expérimentale connue pour inhiber mTOR. De plus, nous montrons que l'inhibition de l'expression de la PIMT est dépendante de mTOR mais semble indépendante de la PI3K. Pour cela, nous avons employé des inhibiteurs de la PI3K (Wortmannin, LY294002), un analogue inactif (LY303511) qui n'agit pas sur la PI3K mais qui a été rapporté pour inhiber l'activité de mTOR, et un inhibiteur d'AKT. Enfin, nous avons utilisé un siRNA dirigé contre mTOR et montré que cela entraînait une diminution de 50% de l'expression de mTOR et de la PIMT. Ces résultats suggèrent fortement un mécanisme de régulation de la PIMT par mTOR. Sachant que mTOR est surexprimée dans certains cancers, l'inhibition de l'expression de la PIMT par l'inhibition de mTOR pourrait avoir une implication thérapeutique.

Mots clés : Protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase (PIMT); mammalian target of rapamycin (mTOR); Glioblastomes; Inhibiteurs des kinases; Voies de signalisation

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase

Les organismes vivants possèdent le pouvoir réparer les dommages macromoléculaires provoqués par les modifications chimiques. Un exemple très documenté à cet effet est la réparation de l'ADN. D'un autre côté, on connaît moins les mécanismes de réparation des protéines. Or, il existe différentes catégories d'enzymes communément caractérisées par leur fonction de réparation des protéines. Parmi celles-ci, notre projet étudie spécifiquement la protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase (PIMT).

La PIMT catalyse le transfert d'un groupement méthyle du S-adenosyl-L-méthionine (AdoMet) au groupement α -carboxyle d'un résidu L-isoaspartate anormal d'une protéine (Aswad, 1995). Le produit de la réaction est une protéine dont le résidu L-isoaspartate est remplacé par un résidu L-aspartate normal. Il y a aussi formation de S-adenosyl-L-homocystéine (AdoHcy), qui agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la réaction de méthylation (fig. 1.1). La formation de résidus L-isoaspartates survient de façon spontanée. C'est le produit de la déshydratation de l'aspartate ou de la désamidation de l'asparagine, un processus généralement associé au vieillissement des protéines (Clarke, 2003). C'est pourquoi la PIMT est considérée comme une protéine de réparation. Cependant, des travaux récents tentent de montrer que la formation de résidus L-isoaspartates serait aussi un mécanisme de régulation des protéines (Aswad et Reissner, 2003). De plus, d'autres chercheurs avancent même l'hypothèse que la désamidation de l'asparagine serait un processus lié aux horloges moléculaires intracellulaires (Robinson et Robinson, 2004). Cela soulève l'implication de la PIMT dans des processus clés de la biologie cellulaire.

L'activité de méthylation a été observée pour la première fois par Axelrod et Daley en 1965. Ils ont remarqué la formation de méthanol radioactif quand ils ajoutaient du [^3H]-AdoMet aux extraits pituitaires (Axelrod et Daley, 1965). D'ailleurs, on utilise toujours l'AdoMet radioactif pour mesurer expérimentalement l'activité enzymatique de la PIMT. Plus tard, l'équipe de Liss a publié un article montrant la purification partielle d'une enzyme de méthylation (Cuprak *et al.* 1969). En 1970, Kim et Paik ont rapporté la purification d'une enzyme de méthylation dépendante de l'AdoMet qu'ils ont nommée protéine méthylase II (Kim et Paik, 1970). Trois ans plus tard, on est arrivé à la conclusion que les enzymes rapportées par Liss, Kim et Paik étaient la même qu'Axelrod et Daley avaient découverte (Aswad, 1995). Par la suite, il y a eu deux découvertes révélatrices. D'une part, la confirmation d'une activité carboxyle méthyltransférase au niveau pituitaire; d'autre part, la démonstration que certaines hormones pituitaires étaient de bien meilleurs accepteurs de groupements méthyles que l'ovalbumine (Axelrod et Diliberto, 1974).

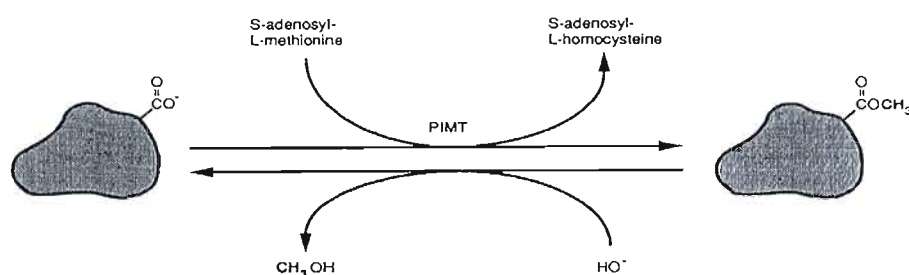


Figure 1.1 Réaction enzymatique de méthylation par la PIMT. (Tirée de Aswad, 1995)

Les années passèrent et plus de 60 articles concernant la carboxyle méthyltransférase ont été publiés. Les recherches portaient sur les propriétés et les fonctions de l'enzyme. Bref, plusieurs hypothèses ont été émises, allant d'un rôle dans la circulation vésiculaire à la méthylation membranaire associée au chimiotactisme, tout comme c'est le cas chez les bactéries. Seulement, les efforts dans le but de lui attribuer une fonction biologique ont été

peu concluants. Finalement, en 1984, deux articles scientifiques ont montré que le groupement carboxyle libre sur le résidu L-isoaspartate de l'adrenocorticotropine était un excellent site de méthylation pour l'enzyme (Aswad, 1984; Clarke, 1984). De plus, l'équipe de Clarke a démontré que la méthylation pouvait s'effectuer sur un résidu D-aspartate, mais cela avec un rendement 1500 à 20 000 fois plus faible que le résidu L-isoaspartate (Clarke et Lowenson, 1992). C'est ainsi qu'on en est venu à la dénomination de protéine L-isoaspartate (D-aspartate) méthyltransférase.

1.1.1 Les propriétés de la PIMT

La première étude relatant d'une activité méthyltransférase a été effectuée sur des extraits pituitaires. Le premier substrat porteur d'un groupement L-isoaspartate de la PIMT à avoir été caractérisé est une hormone pituitaire (Aswad, 1984; Clarke, 1984). Or, ce n'est guère surprenant vu que l'on sait maintenant que la PIMT est enrichie dans le cerveau. C'est en effet au niveau du cerveau et des testicules que l'on détecte les plus hauts taux d'expression de la PIMT (Mizobuchi *et al.* 1994). Globalement, la PIMT a été détectée et étudiée chez les bactéries, les plantes et les animaux (Aswad et Reissner, 2003). Au niveau cellulaire, les études montrent que la PIMT est concentrée dans le cytosol (Clarke, 1985). Pourtant, une forme membranaire de la PIMT a été rapportée (Boivin *et al.* 1993). De plus, une équipe a mis en évidence, chez *Arabidopsis*, un deuxième gène de la PIMT dont les protéines sont séquestrées dans le noyau (Xu *et al.* 2004).

La PIMT a un poids moléculaire d'environ 24 500 Da, une constante d'affinité (K_m) pour l'AdoMet de 1 à 3 μ M et une constance d'inhibition (K_i) par l'AdoHcy de 0.5 à 1.5 μ M (Aswad, 1995; Gingras *et al.* 1994). Chez l'humain, il existe deux isoformes de la PIMT résultant de l'épissage alternatif d'un gène situé sur le chromosome 6 (Clarke, 2003). Ces isoformes se distinguent par leur point isoélectrique (pI) et leur région C-terminale. L'une ayant un pI de 6.5 avec une région C-terminale : Arg-Trp-Lys-COOH et l'autre ayant un pI de 5.5 avec une région C-terminale : Arg-Asp-Glu-Leu-COOH (Gingras *et al.* 1994). On peut noter la similitude entre cette dernière séquence C-terminale et le signal de rétention du réticulum endoplasmique : Lys-Asp-Glu-Leu-COOH (Voet et Voet, 2004). Cela suggère que

la PIMT puisse être ciblée au réticulum endoplasmique. Pourtant, on n'a jamais observé une activité de la PIMT dans le réticulum endoplasmique.

Dans un autre ordre d'idée, il est connu que la PIMT a un polymorphisme à la position 120. Cette position peut contenir soit une valine, soit une isoleucine (Ile120Val). La fréquence de ce polymorphisme est distribuée de façon hétérogène dans la population (DeVry et Clark, 1999). L'analyse d'extraits cellulaires sanguins a apporté des informations au sujet de ces deux variantes de la PIMT. La PIMT avec la valine en position 120 a une plus grande affinité pour les protéines endommagées, tandis que celle ayant une isoleucine a une plus grande « thermostabilité » et activité spécifique (David *et al.* 1997; DeVry et Clarke, 1999).

1.1.2 Le mécanisme de réparation des protéines par la PIMT

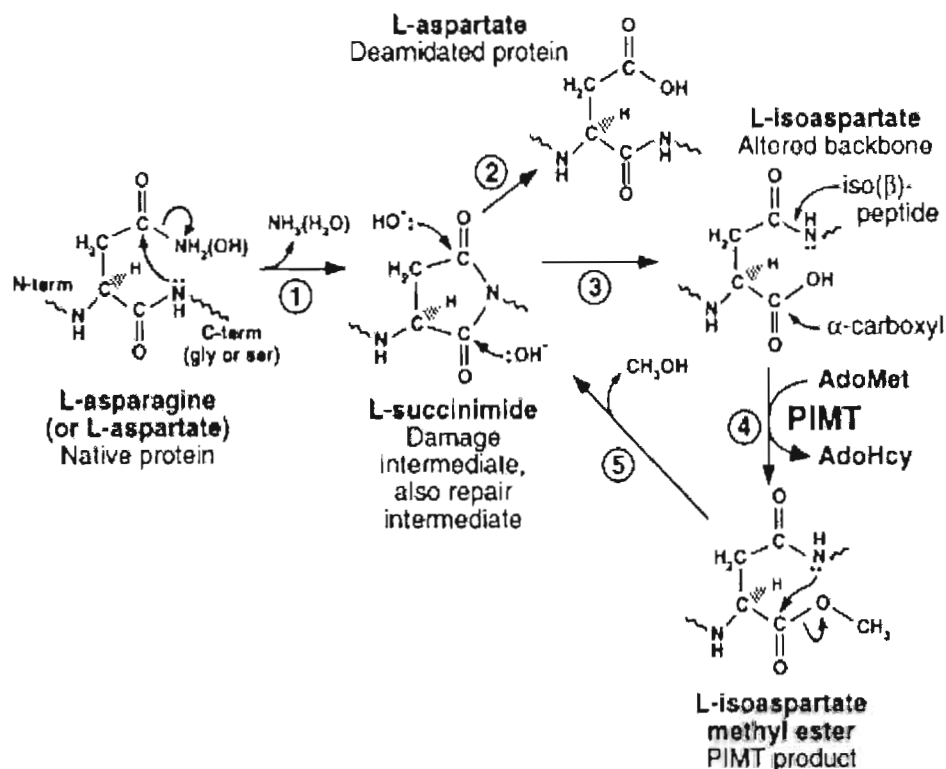


Figure 1.2 Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT. (Tiré de Carson *et al.* 2002)

La figure 1.2 montre les mécanismes de réparation des protéines par la PIMT. La formation du résidu L-isoaspartate résulte de la translocation de la liaison peptidique sur le groupement carboxyle de la chaîne latérale. Or, cette réaction est influencée par deux facteurs : l'acide aminé qui suit l'asparagine ou l'aspartate, et la structure tridimensionnelle de la protéine (Clarke, 2003). En effet, le L-isoaspartate se forme plus facilement quand le résidu qui suit est un acide aminé petit et hydrophile, par exemple, la glycine. De plus, la formation des résidus L-isoaspartates est favorisée par la flexibilité de la chaîne polypeptidique environnant l'asparagine ou l'aspartate (Xie et Schowen, 1999). Finalement, les protéines contenant des résidus L-isoaspartates anormaux sont reconnues par la PIMT. Il s'ensuit la méthylation par la PIMT du carboxyle en position α , la formation d'un intermédiaire succinimide et l'hydrolyse spontanée de ce dernier pour générer un L-aspartate et un L-isoaspartate. Ainsi, chaque cycle de méthylation par la PIMT conduit à la réparation d'environ 30% des résidus L-isoaspartates en résidus L-aspartates.

1.2 La PIMT et l'étude de son rôle biologique

La PIMT a pour fonction de limiter l'accumulation de résidus L-isoaspartates au niveau des protéines. Du coup, on peut faire la corrélation entre l'accumulation de résidus L-isoaspartates et la perte d'activité des protéines. En effet, cela a été mis en évidence avec la diminution de l'activité de la calmoduline qui a été vieillie *in vitro* afin d'accumuler des résidus L-isoaspartates. L'expérience va plus loin en montrant la récupération de l'activité de la calmoduline suite à la méthylation *in vitro* par la PIMT (Johnson, Langmark et Aswad, 1987). Dans une expérience récente, notre laboratoire a employé du collagène de type-I de rats âgés de 18 mois, et montré que la réparation de ce dernier par la PIMT recombinante permettait une reprise de la migration cellulaire (Lanthier et Desrosiers, 2004). Ces expériences confirment que la PIMT joue un rôle important dans la biologie des cellules.

1.2.1 Le rôle de la PIMT dans les désordres neurologiques

Le cerveau est l'organe où la PIMT est le plus exprimée. C'est aussi au niveau du cerveau que la recherche sur la PIMT a apporté le plus de résultats. D'ailleurs, le lien entre la PIMT et certains désordres neurologiques est bien démontré. D'abord, une équipe a montré que les souris dont le gène *Pimt* a été supprimé meurent d'épilepsie (Yamamoto, 1998). Trois ans plus tard, une expérience est venue appuyer les résultats précédents. En effet, elle a montré le lien entre la sous expression de la PIMT et la tubuline endommagée dans l'hippocampe d'humain épileptique (Lanthier *et al.* 2002). Dans une autre expérience, une équipe a montré, dans un premier temps, qu'une molécule anti-parkinsonienne induisait la PIMT dans les cellules astrogliales et, dans un deuxième temps, que la surexpression de la PIMT dans les neurones protégeait de l'apoptose induite par *Bax* (Huebscher, 1999). La surexpression de la PIMT a aussi été associée à une autre maladie neurologique. Cette fois, par analyse protéomique comparative, une équipe a identifié la PIMT parmi une liste de protéines surexprimées dans la dégénération corticobasale (Chen, Ji et Ru 2005). Le polymorphisme de la PIMT (Ile120Val) s'avère être un facteur à prendre en considération dans l'étude de la PIMT. Récemment, une étude a fait le lien entre le polymorphisme de la PIMT et le spina-bifida. Ce qui se dégage de l'étude est l'observation que le génotype Val/Val était associé à un faible risque d'être atteint du spina-bifida (Zhu *et al.* 2006).

Malgré toutes ces études qui confirment l'importance de la PIMT dans le cerveau, on n'a toujours pas mis le doigt sur les mécanismes précis par lesquels la PIMT jouerait ces rôles. On rapporte des hypothèses, mais aucune signature moléculaire. De ce fait, l'avenir de la recherche sur la PIMT doit passer par la compréhension des mécanismes moléculaires associés à son expression. En d'autre terme, pour comprendre l'implication biologique de la PIMT, il faut trouver les protéines ainsi que les voies de signalisation qui contrôlent son expression.

1.2.2 La PIMT, une nouvelle cible de la protéine mTOR

La fonction anti-apoptotique attribuée à la PIMT laisse supposer que cette enzyme serait impliquée dans la survie cellulaire. Or, notre équipe vient de montrer une diminution de l'expression et de l'activité de la PIMT dans les glioblastomes qui sont les tumeurs les plus fréquentes du cerveau (Lapointe *et al.* 2005). Nous avons par la suite mis nos efforts dans l'étude du rôle de la PIMT sur les voies de survie cellulaire. C'est ainsi que nous avons découvert que la PIMT est une nouvelle cible de la protéine kinase mTOR (*the mammalian target of rapamycin*). Le chercheur Steven Clarke et son équipe ont montré que chez les souris déficientes pour la PIMT, il y avait une activation de la voie PI3K/AKT et une augmentation de l'expression du récepteur de l'insuline (Farrar, Houser et Clarke, 2005). Par contre, avant la parution de cet article, aucune recherche sur les voies de signalisation qui régulent la PIMT n'avait été publiée. Les résultats de Clarke viennent appuyer les nôtres qui montrent la régulation de la PIMT par mTOR, une protéine connue pour être régulée par la voie insuline/PI3K/AKT.

1.3 mTOR

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase qui fait partie de la famille des PIKK, *PI3K-related protein kinase* (Huang et Houghton, 2003). mTOR est aussi dénommée FRAP (*FK506-binding protein 12 [FKBP12]- and rapamycin-associated protein*). Cette protéine a été identifiée pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (TOR1 et TOR2). En fait, les levures sont la cible de la rapamycine, un agent antifongique sécrété par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. Lorsqu'on s'est intéressé au mécanisme d'action de la rapamycine, on a montré que sa fonction antifongique passe par l'inhibition spécifique de la protéine TOR. Puis, le mécanisme d'action de la rapamycine a été confirmé chez divers organismes. D'ailleurs, mTOR est bien conservée chez les mammifères puisqu'il y a 95% d'homologie entre les protéines de l'humain, la souris et le rat (Bjornsti et Houghton, 2004).

1.3.1 La structure et les fonctions de mTOR

mTOR est une protéine de haut poids moléculaire (289 kDa) dont la structure primaire révèle la présence de domaines structuraux (fig. 1.3). La région N-terminale consiste en 20 motifs en tandem HEAT (*huntingtin, EF3, a subunit of PP2A and TOR*). Chacun d'eux possède deux hélices α de 40 acides aminés dont le caractère hydrophobe et hydrophile varie d'un motif à l'autre. Les motifs HEAT sont présents dans différentes protéines et jouent un rôle dans les interactions entre protéines (Andrade et Bork 1995). Les motifs HEAT sont suivis d'un domaine FAT (*FRAP-ATM-TRRAP*), domaine qu'on retrouve chez d'autres protéines de la famille PIKK. La fonction du domaine FAT serait de réguler l'activité de mTOR (Bosotti, Isacchi et Sonnhammer, 2000; Jacinto et Hall, 2003). Ensuite, on retrouve un domaine FRB (*FKBP12-rapamycin-binding domain*). Ce domaine lie le complexe inhibiteur composé de l'immunophiline FKBP-12 et la rapamycine. La région C-terminale de mTOR est représentée par un domaine CD (*catalytic kinase domain*), un domaine RD (*repressor domain*) et finalement un domaine FATC (*FAT C terminus*). Une caractéristique frappante du domaine CD est sa similitude avec celui de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Par ailleurs, ce domaine est retrouvé chez d'autres kinases telles que ATM, ATR, DNA-PK (Proud, 2004). L'activité de mTOR est dépendante de l'intégrité du domaine FATC. On a même montré qu'une délétion d'un seul acide aminé de ce domaine supprime l'activité de mTOR (Takahashi *et al.* 2000). De plus, les domaines FATC et FAT interagiraient pour donner une configuration qui expose le domaine CD. Enfin, entre les domaines CD et FATC se trouve un domaine RD qui est impliqué dans la régulation négative de mTOR (Hay et Sonenberg 2004).



Figure 1.3 Représentation des domaines de la structure primaire de mTOR (Tirée de Bjornsti et Houghton, 2004)

La protéine mTOR existe sous deux complexes protéiques distincts. Ils sont composés des protéines mTOR et GβL, lesquelles peuvent interagir avec, d'un côté, la protéine raptor ou, d'un autre côté, la protéine rictor (Sarbasov, Ali et Sabatini, 2005). Le complexe avec rictor n'a été identifié que récemment (Sarbasov *et al.* 2004). Ceci a ouvert la voie à une nouvelle approche dans l'étude de mTOR. Le complexe mTOR-GβL-raptor est caractérisé par sa sensibilité à la rapamycine, tandis que le complexe mTOR-GβL-rictor ne l'est point (Guertin et Sabatini, 2005). Pour notre étude, nous ne considérerons que la forme de mTOR complexée à raptor et sensible à la rapamycine.

La fonction principale de mTOR est le contrôle de la synthèse des protéines. Les protéines S6K1 et 4E-BP1 sont les deux substrats reconnus de mTOR. D'une part, mTOR contrôle la synthèse des protéines ribosomales en phosphorylant la protéine S6K1. D'autre part, mTOR phosphoryle la protéine 4E-BP1. Une fois phosphorylée, 4E-BP1 se dissocie de la protéine eIF4E, laquelle va stimuler la traduction des ARNm possédant une coiffe (*cap-dependent translation*). Néanmoins, la phosphorylation directe de ces protéines par mTOR reste à confirmer. L'effet global de la phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 par mTOR est la régulation de la croissance cellulaire. En fait, l'inhibition de mTOR entraîne l'arrêt de synthèse des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Bjornsti et Houghton 2004). Par ailleurs, mTOR régule négativement l'autophagie, qui est une voie de dégradation des protéines à longue vie (Codogno et Meijer, 2004). En somme, le fait que mTOR contrôle la synthèse des protéines implique qu'il régule une multitude de processus biologique, que ce soit de manière directe ou indirecte. Il n'est pas étonnant qu'on découvre qu'un grand nombre d'événements moléculaires sont reliés à mTOR. On peut citer la réponse au stress, l'hypoxie, l'angiogenèse et l'apoptose comme exemples.

1.3.2 Les voies de signalisation de mTOR

En plus de contrôler la synthèse des protéines, mTOR est considérée comme un régulateur central, car elle intègre différentes voies de signalisation qui répondent aux nutriments et aux facteurs de croissance. De plus, les voies de signalisation de mTOR sont

fréquemment suractivées dans certains cancers. Or, il n'est guère surprenant de voir l'intérêt clinique pour les inhibiteurs des voies de mTOR. Les paragraphes suivants seront consacrés à la régulation de mTOR par les nutriments et les facteurs de croissance. Nous discuterons de l'implication de mTOR dans la thérapie anticancéreuse à la section 1.4.

L'activité de mTOR est régulée par les acides aminés et le glucose. En fait de compte, mTOR est régulée par les acides aminés à chaînes branchées, particulièrement la leucine et, dans un degré moindre, la glutamine; mTOR est aussi sensible au niveau cellulaire en ATP qui est dépendant de la glycolyse (Proud, 2004; Hidayat *et al.* 2003). La régulation par les nutriments passerait par un mécanisme de stabilisation et de déstabilisation du complexe mTOR-raptor. Dans une condition riche en acide aminé, mTOR subirait un changement de conformation qui diminuerait son interaction avec raptor, cela aurait pour conséquence d'activer mTOR (Bjornsti et Houghton, 2004). Le mécanisme par lequel le glucose (ATP) régulerait mTOR est encore obscur. On avance qu'une privation d'énergie activerait AMPK qui, à son tour, phosphorylerait le complexe TSC1/2 (fig 1.4). Ce dernier est un hétérodimère composé des protéines harmatin (TSC1) et tuberin (TSC2). Elle possède une fonction GAP (*GTPase-activating protein*) qu'elle exerce sur la petite GTPase Rheb pour l'inhiber. La protéine Rheb, quant à elle, lie mTOR sous sa forme Rheb-GTP et stimule son activité (Long *et al.* 2005). Ainsi, en inhibant Rheb, TSC1/2 agit en tant que régulateur négatif de mTOR (Sarbasov, Ali et Sabatini, 2005).

Une des voies régulant l'activité de mTOR est bien connue. C'est la voie : insuline-PI3K-AKT-mTOR. L'insuline induit une phosphorylation de S6K1 et 4E-BP1 par mTOR (Hay et Sonenberg, 2004). La figure 1.4 décrit la régulation de mTOR par les facteurs de croissance. Tout d'abord, l'activation des récepteurs de facteurs de croissance active la PI3K en recrutant les sous-unités p85 et p110 de celle-ci. PI3K va ensuite catalyser la conversion du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ en $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. Cette réaction est inhibée par PTEN, un suppresseur de tumeur reconnu pour sa délétion chromosomique dans les glioblastomes (Carpentier, 2005). Ensuite, le $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, par l'intermédiaire de PDK1, va activer la protéine AKT, un régulateur positif de mTOR. En effet, AKT inhibe la protéine TSC1/2 et donc active mTOR dans la voie dépendante de raptor. Enfin, mTOR va phosphoryler deux substrats : S6K1 et

insuline/PI3K/AKT/mTOR. Enfin, d'autres protéines réguleraient mTOR. Parmi celles-ci, on retient la kinase ERK.

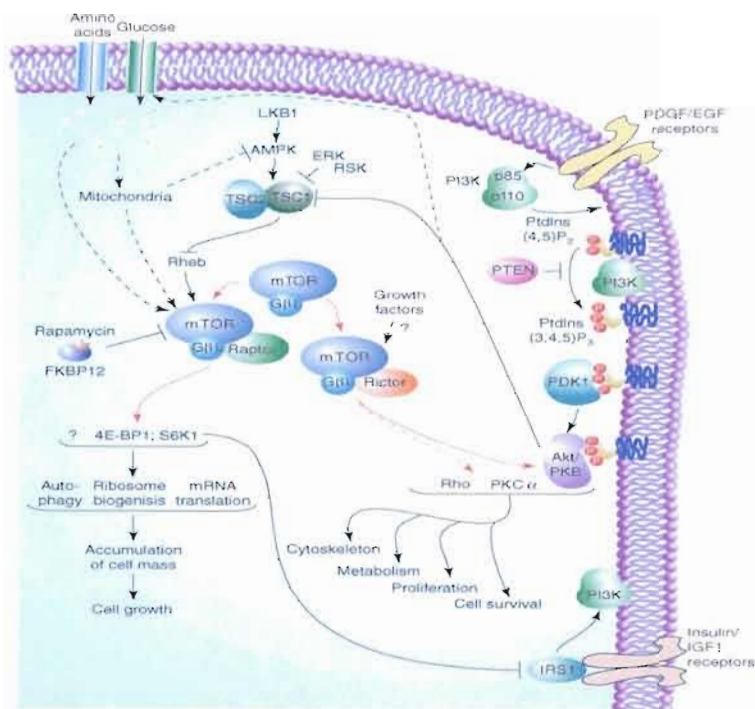


Figure 1.4 Voies de signalisation de mTOR. (Tirée de Sarbassov, Ali et Sabatini, 2005)

1.4 mTOR, une nouvelle cible de la thérapie anticancéreuse

mTOR contrôle la synthèse des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. En d'autres termes, mTOR est un contrôleur central de la croissance cellulaire. Or, le dérèglement de la croissance cellulaire est une des caractéristiques du cancer. Une autre caractéristique, qu'on attribue à certains types de cancers, est la suractivation des voies de signalisation de mTOR (Guertin et Sabatini, 2005). Le rôle que mTOR joue dans la croissance cellulaire et l'intégration des voies de signalisation fait de celle-ci une cible de la thérapie anticancéreuse. Or, différentes stratégies sont mises en oeuvre pour inhiber l'activité

de mTOR dans les cellules cancéreuses. Les stratégies principales sont l'inhibition de mTOR avec la rapamycine, et l'inhibition des protéines qui régulent mTOR en amont (Law, 2005).

La rapamycine a été découverte en tant qu'agent antifongique. Plus tard, la rapamycine s'est révélée être un agent immunosuppresseur. La rapamycine fait partie d'une classe d'immunosuppresseur à laquelle on peut ajouter la cyclosporine et le FK506. Quoiqu'ils aient tous les trois la même action immunosuppressive, le mécanisme d'action de la rapamycine se distingue de celui de la cyclosporine et du FK-506. Les trois immunosuppresseurs vont au départ se lier à une immunophiline. La cyclosporine se lie à la cyclophiline, le FK-506 et la rapamycine, quant à eux, se lient au FKBP-12. Suite à la liaison avec leur immunophiline respective, la cyclosporine et le FK506 vont inhiber l'activité de la calcineurine, tandis que la rapamycine va inhiber l'activité de mTOR. L'inhibition de mTOR par le complexe rapamycine/FKBP-12 se traduit par le blocage de la prolifération des cellules T dans la phase G1 du cycle cellulaire (Goldsby, Kindt et Osborne, 2001).

Par la suite, on a montré que la rapamycine avait une action anti-tumorale dans des modèles de tumeurs transplantées (Law, 2005). Par ailleurs, un des effets secondaires de l'immunosuppression est le risque de développement de tumeurs. Pourtant, une étude a montré que si on employait la rapamycine seule ou en combinaison avec la cyclosporine, on observait dans les deux cas une diminution de la croissance tumorale (Luan, 2002). Dorénavant, la rapamycine est de surcroît considérée comme un agent anti-tumoral. Des travaux antérieurs ont démontré l'effet anti-tumoral de la rapamycine contre plusieurs types de tumeurs, par exemple, les gliomes (Houchens *et al.* 1983; Rowinsky, 2004) D'ailleurs, les compagnies Wyeth-Ayerst Research, Novartis et Ariad Pharmaceuticals Inc ont développé des analogues de la rapamycine, soit le CCI-779, le RAD001 et la AP25373, respectivement.

La seconde stratégie anti-tumorale vise à inhiber indirectement mTOR en ciblant les protéines qui la régulent en amont. Il est connu que la voie PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans la croissance et la survie cellulaire (Vogt, 2001). Une étude a montré que l'inhibition de l'activité de la PI3K entraînait la diminution de la prolifération des cellules de la prostate humaine et que cette diminution de l'activité était corrélée avec une inhibition de la phosphorylation de la S6K1 (Gao, 2003). D'un autre côté, les inhibiteurs de la PI3K sont

employés en synergie avec d'autres composés anticancéreux. En effet, une étude récente a montré que le LY294002 sensibilise les gliomes à la rapamycine (Takeuchi, 2005). Enfin, il est important de savoir que les inhibiteurs de la PI3K (LY294002, Wortmannine) peuvent aussi inhiber directement mTOR (Brunn, 1996). Rappelons que PI3K et mTOR sont des kinases de la même famille, cela implique que les protéines régulées par mTOR sont probablement régulées, au départ, par la PI3K. C'est pourquoi il faut discriminer entre les mécanismes dépendants de PI3K qui passent par la voie PI3K/AKT/mTOR et ceux indépendants de PI3K qui passent par mTOR sans la participation de la PI3K et d'AKT.

1.5 Objectifs

Le rôle que joue la PIMT dans le cerveau est bien documenté. Son absence dans le cerveau s'est révélé néfaste. Cependant, sa surexpression dans des cellules en culture a mis en évidence sa fonction anti-apoptotique. En somme, ces recherches sur la PIMT ont contribué à sa compréhension et démontré que celle-ci occupait une place prépondérante dans divers contextes physiologiques et pathologiques. Malgré ces découvertes, l'environnement moléculaire qui contrôle la PIMT a suscité peu d'intérêt puisqu'on ne s'est point attardé aux voies de signalisation qui régulent l'expression de la PIMT. Nous postulons que la découverte des voies de signalisation qui régulent la PIMT permettra de mieux saisir son rôle dans la cellule. C'est dans cette optique que nous avons analysé le lien entre les voies de signalisation de mTOR et la PIMT. Dans cette étude, nous rapportons pour la première fois un mécanisme de régulation de la PIMT par la kinase mTOR. Pour réaliser ce projet, nous avons choisi un modèle de cellules cancéreuses du cerveau, soit les glioblastomes (U87). Ce choix se justifie par deux raisons : 1) la PIMT est fortement exprimée dans le cerveau incluant les cellules gliales (Shirasawa, 1995); 2) l'expression de la PIMT chute de 80% dans les glioblastomes (Lapointe *et al.* 2005). À partir de ce modèle cellulaire, nous avons montré que la kinase mTOR est un régulateur positif de l'expression de la PIMT car l'inhibition de mTOR, par l'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques et d'un siRNA, entraîne une diminution de l'expression de la PIMT.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

La lignée cellulaire U87 (glioblastome) a été obtenue de ATCC (Manassas, VA). La rapamycine, le LY294002, le FK-506 et la cyclosporine A proviennent de LC Laboratories (Woburn, MA), tandis que la Wortmannine, le LY303511 et le 3-Méthyladenine proviennent de Sigma Aldrich (Oakville, ON). Le PD98059, le SB203580 proviennent de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA), le SP600125 de Cerdalane (Hornby, ON). L'inhibiteur d'AKT (AKT inhibitor I) provient de Calbiochem (La Jolla, CA). Le siRNA contre mTOR a été obtenu de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). L'anticorps contre la PIMT a été conçu dans notre laboratoire. Les anticorps contre la S6K1, la phospho-S6K1 (T389), et l' α -tubuline ont été obtenus de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps contre AKT, phospho-AKT (S473), mTOR, phospho-mTOR (S2448), ERK1/2, phospho-ERK1/2 (T202/Y204), p38, phospho-p38 (T180/Y182), JNK et phospho-JNK (T183/Y185) proviennent de Cell Signaling Technology. L'anticorps contre la β -actine a été obtenu de Sigma Aldrich. Les anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris proviennent de Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

La culture cellulaire a été effectuée dans une atmosphère contenant 5% CO₂. Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu essentiel minimal (MEM : Hyclone Laboratories, Logan, UT) dans lequel on a ajouté 10% de sérum de veau (SV) et 1 mM de pyruvate. Dans

certaines expériences, les cellules ont été cultivées dans du milieu MEM ne contenant pas de glutamine (Hyclone Laboratories, Logan, UT) et dans lequel on a ajouté 10% de SV.

2.2.2 Traitements avec les inhibiteurs pharmacologiques

50 000 cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits, cultivées pendant 48 heures, et traitées avec l'inhibiteur de mTOR (Rapamycine), les immunosuppresseurs (Rapamycine, FK-506, Cyclosporine), les inhibiteurs de la PI3K (Wortmannine, LY294002), l'analogue inactif de LY294002 (LY303511), l'inhibiteur d'AKT ainsi que les inhibiteurs des MAP kinases (PD98059, SB203511, SP600125). Dans d'autres expériences, les cellules ont été cultivées pendant 24 heures et préalablement traitées avec l'inhibiteur de l'autophagie (3-Méthyladenine). La présence de Me₂SO était de 0.1% pour toutes les expériences.

2.2.3 Transfection des cellules avec un siRNA contre mTOR

50 000 cellules U87 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et cultivées pendant 24 heures dans du milieu MEM. Ensuite, le milieu cellulaire a été remplacé par du milieu MEM frais. Parallèlement, des mélanges de transfection ont été préparés en se référant au protocole du fournisseur. Ceux-ci contenaient un volume de milieu MEM, d'agent de transfection HiPerfect (QIAGEN) plus ou moins le siRNA contre mTOR. Les mélanges ont été ajoutés aux cellules de façon à ce que la concentration finale du siRNA soit de 100 nM. Après 48 heures, les cellules ont été lysées et l'efficacité de transfection a été visualisée en détectant mTOR par immunobuvardage de type Western.

2.2.4 Lyse cellulaire

Les cellules ont été lavées à deux reprises avec un tampon phosphate salin (PBS) (NaCl 150 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,3 mM, Na₂HPO₄•7H₂O 8,1 mM à pH 7,40) froid ne contenant ni Ca²⁺ ni Mg²⁺. Puis, les cellules ont été grattées dans un tampon de lyse CHAPS froid (CHAPS 1%, NaCl 300 mM, EDTA 1mM, Tris 50 mM à pH 7.40). Suite à la lyse, les cellules ont été transférées dans un tube et laissées sur glace pendant 20-30 minutes avec

agitation à 10 min d'intervalle. On a ensuite procédé à une centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C) et récupéré les surnageants qui ont été conservés à -40°C.

2.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et électrotransfert

Les échantillons de protéines ont été dosés selon la méthode micro-BCA de Pierce (Rockford, IL). Ensuite, 20 µg de protéines (40 µg pour mTOR et p-mTOR) ont été préparés dans un tampon d'échantillon (Tris-HCl 62.5 mM à pH 6.8, glycérol 10%, SDS 2%, β-mercapto-éthanol 5%, bleu de bromophénol 0.00625%), chauffés à 100°C pendant 4 min et mis sur gel de polyacrylamide selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels de séparation contenaient 12.5% (p/v) d'acrylamide (7.5% pour mTOR et p-mTOR) et 0.3% (p/v) N,N'-méthylène-bis-acrylamide, 0.375 M de Tris-HCl à pH 8.8, 0.1% de SDS, 1 µl/ml de N,N,N',N',-tétraméthyléthylènediamine (TEMED), et 0.5 mg/ml de persulfate d'ammonium (APS). Les gels d'entassement contenaient 3.8% d'acrylamide et 0.1% N,N'-méthylène-bis-acrylamide, 0.125 M de Tris-HCl à pH 6.8, 0.1% de SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0.5 mg/ml d'APS. La migration a débuté à 100 Volts pendant 30 min et s'est poursuivie à 150 Volts jusqu'à ce le bleu de bromophénol sorte du gel.

Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) de 0.45 µm de porosité. Les transferts ont duré 80 min à 80 mA par gel dans un tampon contenant 96 mM de glycine, 10 mM de Tris et 10% de méthanol. Suite au transfert, les membranes PVDF ont été incubées toute la nuit à 4°C dans un tampon Tris salin (TBS) de blocage (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM à pH 7.5) contenant 0.1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre.

2.2.6 Immunodétection des protéines par buvardage Western

Par la suite, les membranes PVDF ont été lavées 3 fois pendant 15 min dans un tampon TBS contenant 0.3% de Tween-20. Puis, les membranes PVDF ont été incubées durant 1 h avec les anticorps primaires dilués dans une solution de TBS contenant 0.1% de Tween et 3% de BSA à 1 :1000 pour la PIMT, mTOR, phospho-mTOR, AKT, phospho-AKT, ERK1/2,

phospho-ERK1/2, p38, phospho-p38, JNK, et phospho-JNK; 1:200 pour la S6K1, la phospho-S6K1 et l' α -tubuline; 1:100 000 pour la β -actine. Ensuite, les membranes PVDF ont été lavées 3 fois pendant 15 min dans un tampon TBS contenant 0.3% de Tween-20 et incubées durant 1 h à température pièce avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase dilués 1:2500 dans du TBS contenant 0.1% de Tween-20 et 5% de lait en poudre. Les anticorps secondaires de lapin ont été utilisés contre la PIMT, la phospho-S6K1, mTOR, phospho-mTOR, ERK1/2, phospho-ERK1/2, p38, phospho-p38, JNK, phospho-JNK et l' α -tubuline. Les anticorps secondaires de souris ont été utilisés contre la S6K1, AKT et la β -actine. Finalement, les membranes PVDF ont été incubées pendant 1 min dans une solution de signal de chemiluminescence (ECL) et exposées sur des films Fuji pour immunodétecter les protéines d'intérêt.

2.2.7 Isolement de l'ARN

Après les traitements avec la rapamycine, le milieu MEM a été enlevé puis les cellules ont été lysées directement dans du Trizol (Invitrogen, Burlington, ON). Les mélanges obtenus ont été transférés dans des tubes et incubés pendant 5 min à température pièce. Puis, un volume de chloroforme a été ajouté aux mélanges. Ces derniers ont par la suite été agités vigoureusement, incubés à température pièce pendant 30 min et centrifugés à 12 000 g pendant 15 min à 4°C. Les phases aqueuses supérieures ont été transférées dans des tubes. Un volume d'isopropanol a été ajouté à celles-ci pour précipiter l'ARN, mélangées par inversion et centrifugées à 12 500 g pendant 10 min à 4°C. Ensuite, les surnageants ont été enlevés. Les culots d'ARN obtenus ont été lavés avec un volume d'éthanol 75% et centrifugés à 9500 g pendant 5 min à 4°C. Finalement, l'éthanol a été enlevé, les culots d'ARN ont été asséchés à l'air libre pendant 5-10 min et conservés à -80°C.

2.2.8 RT-PCR

Pour chaque réaction de RT-PCR, 1 μ g d'ARN a été utilisé. L'ARN a été transcrit en ADN et amplifié avec les amorces spécifiques de la PIMT et de l' α -tubuline. La séquence de l'amorce sens de la PIMT est: 5'-GAA GCC CCT TAT GAT GCC ATTC-3' et celle de

l'amorce antisens est : 5'- TTT GAG GAC TGA AGA TGA GCA ATCC-3', générant un produit de 299 pb pour l'isoforme I et 346 pb pour l'isoforme II (Lanthier *et al.* 2002). Comme témoin interne, l'amplification de l' α -tubuline a été effectuée avec une amorce sens : 5'-GCC ATT GCC ACC ATC AAGAC-3', et antisens : 5'-CAC ACC AAC CTC CTC ATA ATC CTTC-3'. Les réactions de RT-PCR ont été effectuées avec le « SuperScript One-Step RT-PCR with *Platinum Taq System* » d'Invitrogen (Burlington, ON). La transcription (RT) a été effectuée à 50°C, 20 min, suivie d'une étape de dénaturation à 94°C, 2 min. L'amplification a été effectuée à 94°C, 45 sec; 52°C, 45 sec; 72°C, 90 sec durant 30 cycles suivie d'un prolongement de 7 min à 72°C. Finalement, les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose 1.8% contenant du bromure d'éthidium.

2.2.9 Analyses statistiques

Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les moyennes et les écarts-types ont été déterminés avec les logiciels Excel de Microsoft et Prism pour Macintosh. Les analyses statistiques ont été réalisées selon la méthode du test de Student avec les valeurs $p < 0.05$ qui sont considérées significativement différentes par rapport aux témoins.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 La rapamycine inhibe l'expression de la PIMT

Il a été montré que pour des concentrations inférieures et égales à 1 μM , la rapamycine inhibait l'activité de mTOR de façon spécifique (Davies *et al.* 2000). Or, pour montrer un lien entre l'expression de mTOR et celle de la PIMT, nous avons utilisé l'outil pharmacologique qu'est la rapamycine et démontré qu'elle entraînait une diminution de l'expression de la PIMT dans les cellules U87. En effet, la figure 3.1a montre que la rapamycine inhibe l'expression de la PIMT à une concentration physiologique retrouvée dans le plasma des patients (0.02 μM) et évidemment à une concentration plus élevée (1 μM) durant 20 min. Pour confirmer que l'effet de la rapamycine sur la PIMT était dû à l'inhibition de mTOR, nous avons aussi montré que le traitement avec la rapamycine bloque la phosphorylation de la S6K1 qui est dépendante de la kinase mTOR. Nous avons utilisé un anticorps contre la phospho-S6K1 (p-S6K1) qui détecte la S6K1 phosphorylée sur la thréonine 389 (T389), un site connu pour refléter l'activité de mTOR (Avruch *et al.* 2001). Vu qu'il a été rapporté que mTOR est activée par le sérum (Huang et Houghton, 2003), nous avons effectué l'expérience de traitement avec la rapamycine en présence et en absence de sérum. En présence de sérum, l'expression de la PIMT diminue significativement de 40% à 0.02 μM de rapamycine et de 70% à 1 μM de rapamycine, mais en absence de sérum la PIMT diminue significativement de 50% aux deux concentrations de rapamycine (fig. 3.1b). Il est difficile de dire pourquoi l'inhibition de la PIMT est plus grande en présence de sérum. Il est possible que la présence de sérum protège l'intégrité fonctionnelle de mTOR. C'est possiblement le cas, car il semble y avoir une légère diminution de la phosphorylation de la S6K1 dans le témoin sans sérum (fig. 3.1a). Tout de même, cet effet plus marqué de la rapamycine en présence de sérum nous indique que les expériences de notre projet doivent

être faites en présence de sérum. En somme, ce qui distingue ce résultat est que la PIMT chute en présence de rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTOR.

3.2 La diminution de l'expression de la PIMT n'est pas due à une inhibition de sa transcription génétique ou à une instabilité de l'ARNm

Afin de vérifier si la diminution de l'expression de la PIMT par la rapamycine était au niveau de la transcription ou de la traduction, nous avons effectué une analyse en RT-PCR de l'ARNm de cellules traitées avec 1 μ M de rapamycine. À l'inverse de l'expression de la protéine, l'ARNm des deux isoformes de la PIMT ne varie pas en présence de rapamycine (fig. 3.2). Cela suggère que la diminution de la PIMT par la rapamycine est au niveau de la traduction et non au niveau de la transcription. Cela nous amène aussi à supposer que la PIMT soit dégradée par le traitement avec la rapamycine

3.3 Effet des immunosuppresseurs sur l'expression de la PIMT

Nous avons montré que la rapamycine inhibe l'expression de la PIMT. Étant donné que la rapamycine est un immunosuppresseur, il est important de comparer ses effets avec ceux des immunosuppresseurs. Pour ce faire, nous avons traité les cellules avec deux autres immunosuppresseurs connus : le FK-506 et la cyclosporine A (CsA). À des concentrations faibles et élevées, nous montrons que les immunosuppresseurs diminuent l'expression de la PIMT par rapport au témoin (fig. 3.3). La rapamycine inhibe fortement l'expression de la PIMT à 0,02 et 1 μ M (fig. 3.3, lignes 2 et 3). Le FK-506 inhibe faiblement l'expression de la PIMT à 0,01 μ M, et fortement à 1 μ M (fig. 3.3, lignes 4 et 5). La cyclosporine inhibe faiblement l'expression de la PIMT à 0,1 et 1 μ M (fig. 3.3, lignes 6 et 7). L'effet de la FK-506 et de la cyclosporine A n'est pas relié à mTOR puisqu'ils n'entraînent pas l'inhibition de la phosphorylation de la S6K1 (résultats non montrés). Ces résultats permettent de conclure que la diminution de l'expression de la PIMT n'est pas exclusive à la rapamycine. C'est alors un phénomène associé à divers degrés aux immunosuppresseurs (rapamycine, FK-506, CsA). Toutefois, le fait que la rapamycine est spécifique à mTOR nous a invités à définir son rôle sur l'expression de la PIMT.

3.4 Effet de la privation en glutamine sur l'expression de la PIMT

Il a été rapporté que les acides aminés régulent mTOR (Beugnet *et al.* 2003). Une étude a aussi montré qu'un traitement cellulaire à la rapamycine se comparait à une privation cellulaire en glutamine (Peng, Golub et Sabatini, 2002). Or, pour appuyer nos résultats qui, jusque-là, supportent que l'expression de la PIMT est régulée par mTOR, nous avons privé les cellules en glutamine et analysé les effets sur l'expression de la PIMT, et mTOR. Nos résultats montrent qu'une privation en glutamine pendant 24 h induit significativement une diminution (30%) de l'expression de la PIMT (fig 3.4). Toutefois, l'effet est plus faible que celui de la rapamycine noté précédemment. De plus, la privation en glutamine entraîne une diminution de l'expression de mTOR. Nous avons aussi regardé la p-S6K1 et la forme totale S6K1, leurs quantités ne variaient toutefois pas (résultats non montrés). Enfin, ces résultats indiquent que l'expression de la PIMT serait régulée par des mécanismes physiologiques connus pour contrôler l'expression de mTOR.

3.5 Effet de l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR sur l'expression de la PIMT

Jusque-là, nos résultats suggèrent que la PIMT est régulée par mTOR via des mécanismes physiologiques (glutamine) et pharmacologiques (rapamycine). Maintenant, l'étape suivante avait pour but de vérifier si la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans la régulation de la PIMT. Notre première hypothèse était que l'inhibition de PI3K ou d'AKT entraînerait la même réponse que l'inhibition de mTOR par la rapamycine. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons traité les cellules U87 avec des inhibiteurs de la PI3K et d'AKT et analysé l'expression de la PIMT, puis des formes phosphorylées et totales des protéines AKT, S6K1 et mTOR pour valider les effets des inhibiteurs.

La wortmannine est l'inhibiteur de la PI3K le plus spécifique et le plus efficace (Davies, 2000). Alors, nous avons traité les cellules avec la wortmannine à 0.01, 0,1 et 1 μ M durant 20 min. Les résultats montrent que la wortmannine augmente l'expression de la PIMT mais de façon non significative (fig. 3.5a et 3.5b). Toutefois, on observe une chute complète de la phosphorylation d'AKT et de S6K1 à partir de 0.1 et 1 μ M, respectivement (fig. 3.5a). La

PI3K est responsable de la phosphorylation d'AKT qui, à son tour, est responsable de l'activation de mTOR. Par conséquent, on a une inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR à 1 μ M de wortmannine qui n'entraîne pas une diminution de l'expression de la PIMT. Donc, la PIMT ne semble pas être régulée par la voie PI3K/AKT/mTOR.

Le LY294002 est un autre inhibiteur de la PI3K. Bien qu'il soit largement utilisé, il est moins spécifique et efficace que la wortmannine. De plus, une étude a montré que le LY294002 inhibe préférentiellement mTOR à des concentrations inférieures à 1 μ M (Adi, Wu et Rosenthal, 2001). Comme la wortmannine, nous avons traité les cellules avec des concentrations de 0.01, 0.1 et 1 μ M de LY294002 durant 20 min. Il faut dire que ces concentrations sont nettement inférieures à celles qui sont utilisées dans la littérature qui variaient entre 10 et 50 μ M. Il a été noté que les cellules s'arrondissaient pour des concentrations supérieures à 1 μ M de LY294002, un phénomène qui était aussi observé entre 0.1 et 1 μ M de wortmannine. Quant à l'expression de la PIMT, on remarque qu'elle diminue en fonction de la concentration de LY294002 (fig. 3.6a). La diminution de 30% de l'expression de la PIMT est significative à 1 μ M de LY294002 (fig. 3.6b). Aux concentrations utilisées, le LY294002 n'induit pas une chute de la phosphorylation d'AKT (fig. 3.6a), mais on observe une très faible diminution de la phosphorylation de la S6K1 à partir de 0.1 μ M (fig. 3.6a). Cela indique que la PI3K n'est pas inhibée mais que mTOR est partiellement inhibée. On peut expliquer ceci par le fait que LY294002 soit capable d'inhiber mTOR tout en étant un modeste inhibiteur de la PI3K. Bref, le LY294002 entraîne une diminution de la PIMT. Cette diminution serait plutôt liée à une action inhibitrice sur mTOR.

Le LY303511 est un analogue inactif du LY294002 qui est utilisé comme témoin négatif. Étonnamment, des traitements de 20 min avec le LY303511 entraînent une augmentation de la phosphorylation d'AKT dans les cellules U87 (fig. 3.7a). L'augmentation de la phosphorylation d'AKT par le LY303511 a été rapportée par Kristof *et al.* (2005). De plus, le LY303511 induit une diminution significative de la PIMT entre 0.01 et 1 μ M (fig. 3.7a). À 1 μ M, le LY303511 induit une chute d'environ 50% de la PIMT (fig. 3.7b). On observe aussi une diminution de la phosphorylation de la S6K1 à partir de 0.1 μ M (fig. 3.7a). L'ensemble de ces résultats nous ont incités à examiner l'état de phosphorylation et l'expression de mTOR après un traitement avec le LY303511 et LY294002. Ainsi, on observe une

diminution de la forme phosphorylée et totale de mTOR en fonction de la concentration de LY303511 (fig. 3.7a). Par contre, le LY294002 ne module pas le niveau de phosphorylation et le niveau d'expression de mTOR (fig. 3.7a). Le LY303511 a été rapporté pour inhiber mTOR de façon indépendante de la PI3K (Kristof *et al.* 2005). Tout bien considéré, ces résultats suggèrent que le LY303511 induit une diminution de l'expression de la PIMT qui est dépendante de mTOR.

Nous avons en plus utilisé un inhibiteur d'AKT et montré que ce dernier ne modulait pas l'expression de la PIMT (fig. 3.8a et 3.8b). Or, ce résultat est tout fait logique par rapport à ceux qui ont été obtenus avec la wortmannine. Nous avons même augmenté la concentration de l'inhibiteur d'AKT à 10 μ M sans toutefois constater un effet (résultats non montrés). Par ailleurs, à l'inverse des autres inhibiteurs, celui d'AKT n'entraîne pas une diminution de la phosphorylation de la S6K1 (fig. 3.8a).

3.6 Effet des inhibiteurs des voies des MAP kinases sur l'expression de la PIMT

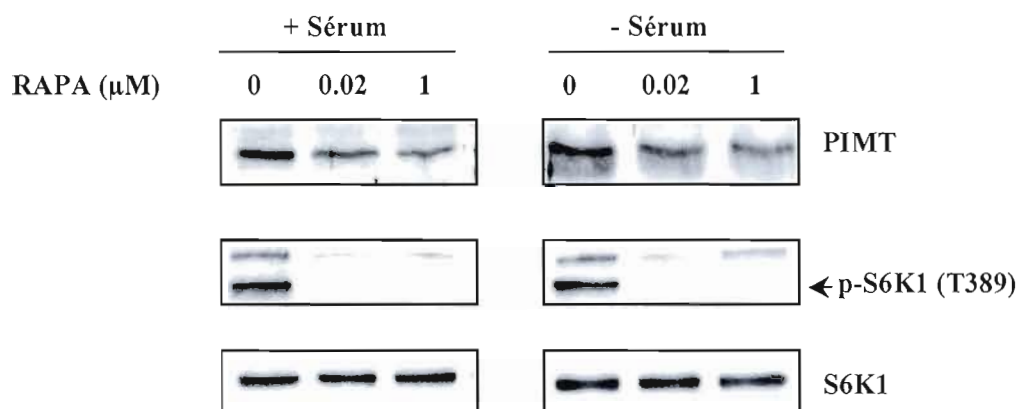
Afin de vérifier le rôle des MAP kinases sur la régulation de la PIMT, nous avons utilisé les inhibiteurs des trois grandes voies des MAP kinases, soit le PD98059, qui inhibe indirectement ERK1/2 via MEK, le SB203580, qui inhibe p38, et le SP600125, qui inhibe JNK. L'inhibition de chacune de ces voies est confirmée par la chute de la phosphorylation des protéines phospho-ERK1/2, phospho-p38 et phospho-JNK (fig. 3.9). Premièrement, l'inhibition de ERK diminue d'environ de moitié l'expression de la PIMT par rapport au témoin (fig. 3.9). Deuxièmement, l'inhibition de la p38 stimule faiblement l'expression de la PIMT par rapport au témoin (fig. 3.9). En troisième lieu, l'inhibition de JNK diminue faiblement l'expression de la PIMT par rapport au témoin (fig. 3.9). Par contre, la spécificité des inhibiteurs en mise en doute car on observe que l'inhibiteur de JNK inhibe la phosphorylation de ERK1/2 (fig. 3.9), que tous les inhibiteurs des voies des MAP kinases inhibent la phosphorylation de la p38 (fig. 3.9), et que l'inhibiteur de MEK inhibe la phosphorylation de JNK (fig. 3.9). Le point positif, tout de même, est que seul l'inhibition de ERK1/2 entraîne une diminution marquée de la PIMT. Cela nous a conduits à soulever l'hypothèse du lien entre la PIMT, ERK et mTOR.

En ce qui concerne la kinase ERK, le seul lien avec mTOR que l'on connaissait est qu'il peut phosphoryler la S6K1 (Lehman et Cambrero-Gomez, 2002). Par conséquent, nous avons regardé la phospho-S6K1 suite aux traitements avec les inhibiteurs. Or, chacun d'eux inhibe la phosphorylation de S6K1 (fig. 3.9). En regardant de plus près, on constate que l'inhibiteur de ERK diminue davantage la phosphorylation de S6K1. Enfin, notre hypothèse du lien entre ERK, mTOR et PIMT vient d'être renforcée par la publication que ERK est capable d'activer mTOR (Sarbasov, Ali et Sabatini, 2005).

3.7 L'inhibition de l'expression de mTOR par siRNA entraîne une diminution de l'expression de la PIMT

À partir de nos résultats avec les inhibiteurs pharmacologiques, nous avons montré un mécanisme de régulation de la PIMT par la kinase mTOR. Les points forts sont l'inhibition de la PIMT par la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTOR, et l'inhibition de la PIMT par le LY303511, une molécule dont l'effet inhibiteur sur mTOR est documenté. Maintenant, afin de montrer de façon spécifique que la PIMT est régulée par mTOR, nous avons utilisé un siRNA dirigé contre l'expression de mTOR. Le siRNA est reconnu pour inhiber de façon spécifique l'expression de la protéine contre laquelle il est ciblé. Dans le cas des inhibiteurs pharmacologiques comme la rapamycine et surtout le LY303511, on ne peut pas être assuré de cette spécificité. Ainsi, la figure 3.10 montre que l'expression à la fois de mTOR et de la PIMT chutent de 50% après que les cellules ont été transfectées avec un siRNA contre mTOR durant 48 heures. L'expression de la α -tubuline, utilisée comme témoin négatif, augmente légèrement quant à elle. Or, ceci confirme alors que la chute de la PIMT n'est point la conséquence d'un arrêt général de la synthèse des protéines. Ces résultats montrent or de tout doute, et pour la première fois, que l'expression de la PIMT est dépendante de mTOR.

(a)



(b)

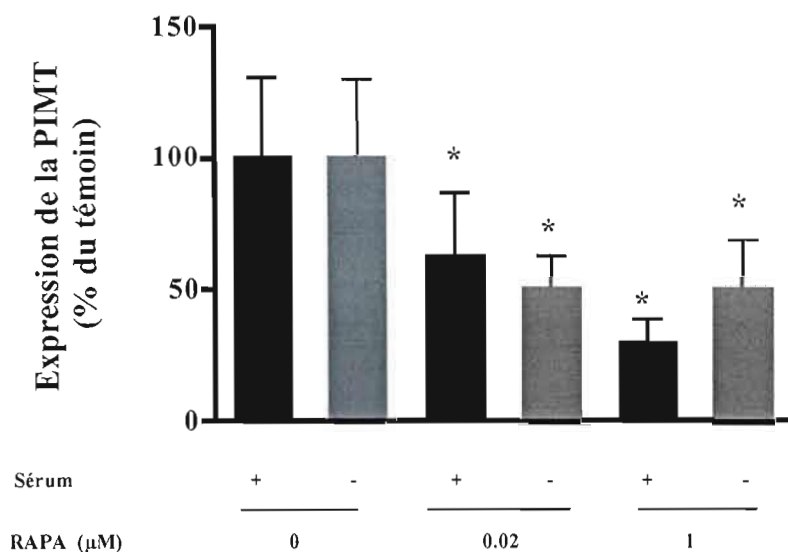


Figure 3.1 La rapamycine inhibe l'expression de la PIMT. (a) D'un côté, les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures, puis traitées avec une concentration physiologique (0,02 μM) et élevée (1 μM) de rapamycine (RAPA) pendant 20 min. De l'autre côté, des cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 24 heures, privées de sérum pendant 18 heures et traitées de la même manière avec la rapamycine. Pour les témoins, les cellules ont été traitées avec du Me_2SO . Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : PIMT, phospho-S6K1 (p-S6K1) et S6K1. (b) L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. L'astérisque (*) identifie les valeurs $p < 0.05$ qui sont considérées significativement différentes par rapport aux témoins.

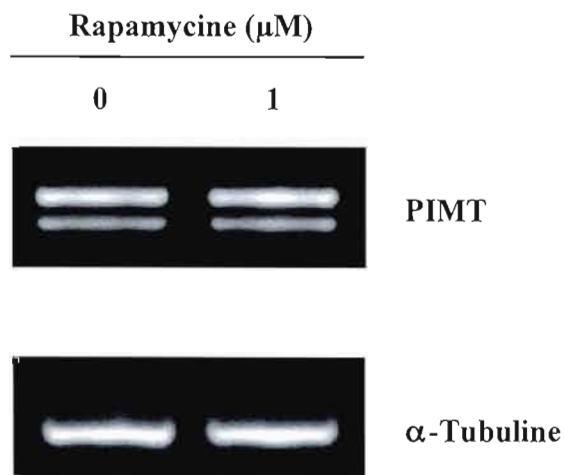


Figure 3.2 La diminution de l'expression de la PIMT n'est pas due à une inhibition de sa transcription génétique ou à une instabilité de l'ARNm. Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures et traitées avec la rapamycine (RAPA) à 1 μM pendant 20 min. Pour le témoin, les cellules ont été traitées avec du Me_2SO pendant 20 min. Ensuite, l'ARN des cellules a été récolté et soumis à un RT-PCR avec les amorces spécifiques pour les deux isoformes de la PIMT et de l' α -tubuline. Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes.

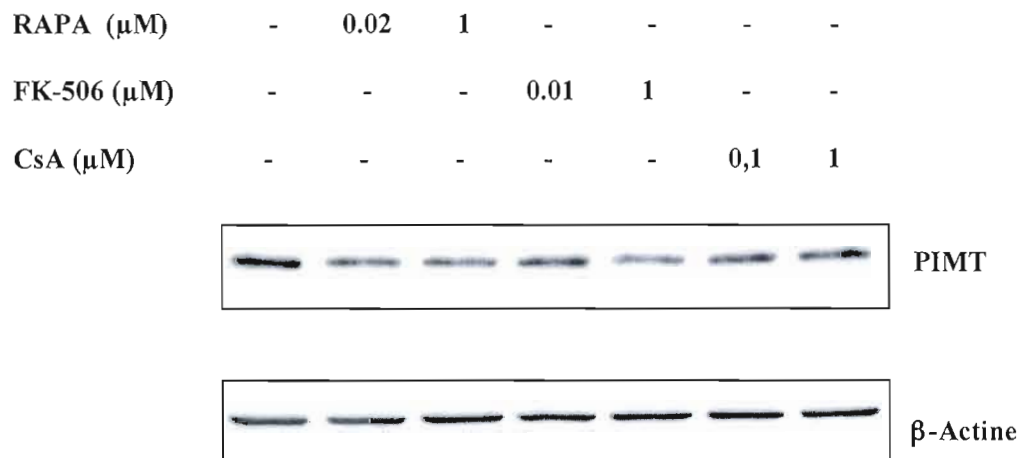
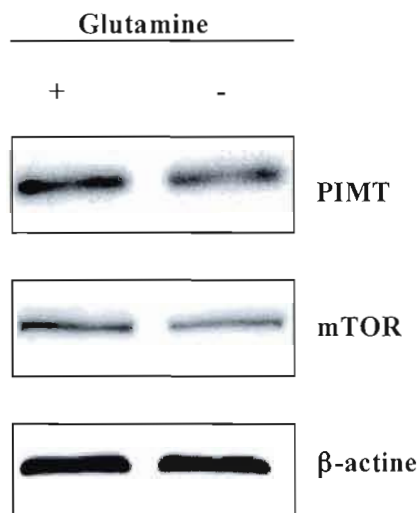


Figure 3.3 L'effet des immunosuppresseurs sur l'expression de la PIMT. Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures et traitées avec des concentrations physiologiques (0.02 μM , 0.01 μM et 0.1 μM) et élevées (1 μM) de rapamycine (RAPA), de FK-506 et de cyclosporine A (CsA) pendant 20 minutes. Pour le témoin, les cellules ont été traitées avec du Me_2SO pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour la PIMT et la β -actine. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

(a)



(b)

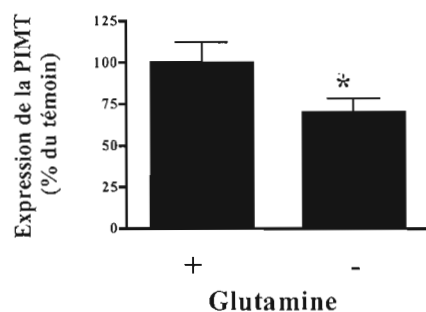


Figure 3.4 L'effet de la privation en glutamine sur l'expression de la PIMT. (a) Les cellules U87 ont été cultivées pendant 24 heures dans un milieu MEM contenant 10% de sérum en présence (2 mM) ou en absence de glutamine. Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : PIMT, mTOR et β -actine. (b) L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. L'astérisque (*) identifie les valeurs $p < 0.05$ qui sont significativement différentes par rapport au témoin.

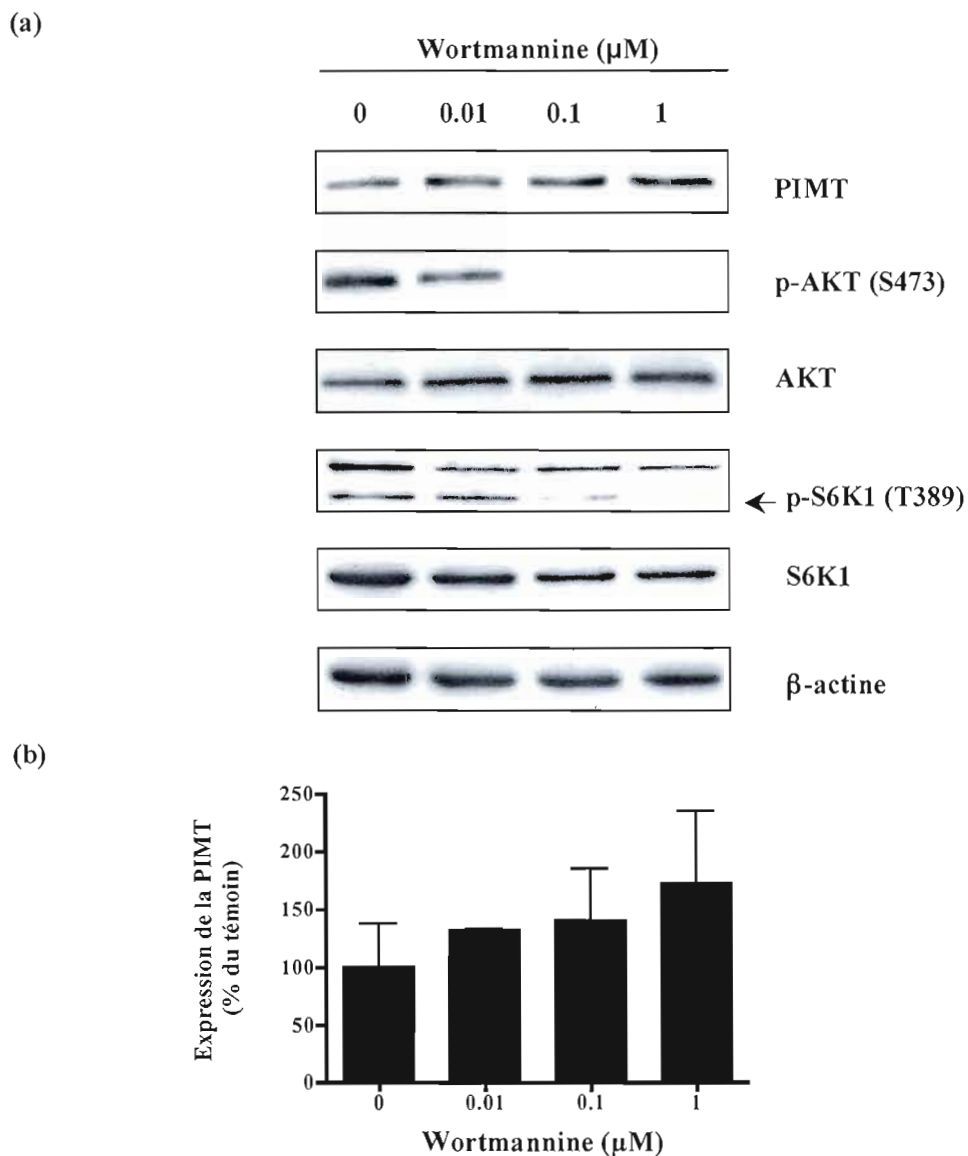


Figure 3.5 Effet de la wortmannine sur l'expression de la PIMT. (a) Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures et traitées avec la wortmannine à 0.01, 0.1 et 1 μM pendant 20 min. Pour le témoin, les cellules ont été traitées avec le Me_2SO . Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : PIMT, phospho-AKT (p-AKT), AKT, phospho-S6K1 (p-S6K1), S6K1 et β -actine. (b) L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes.

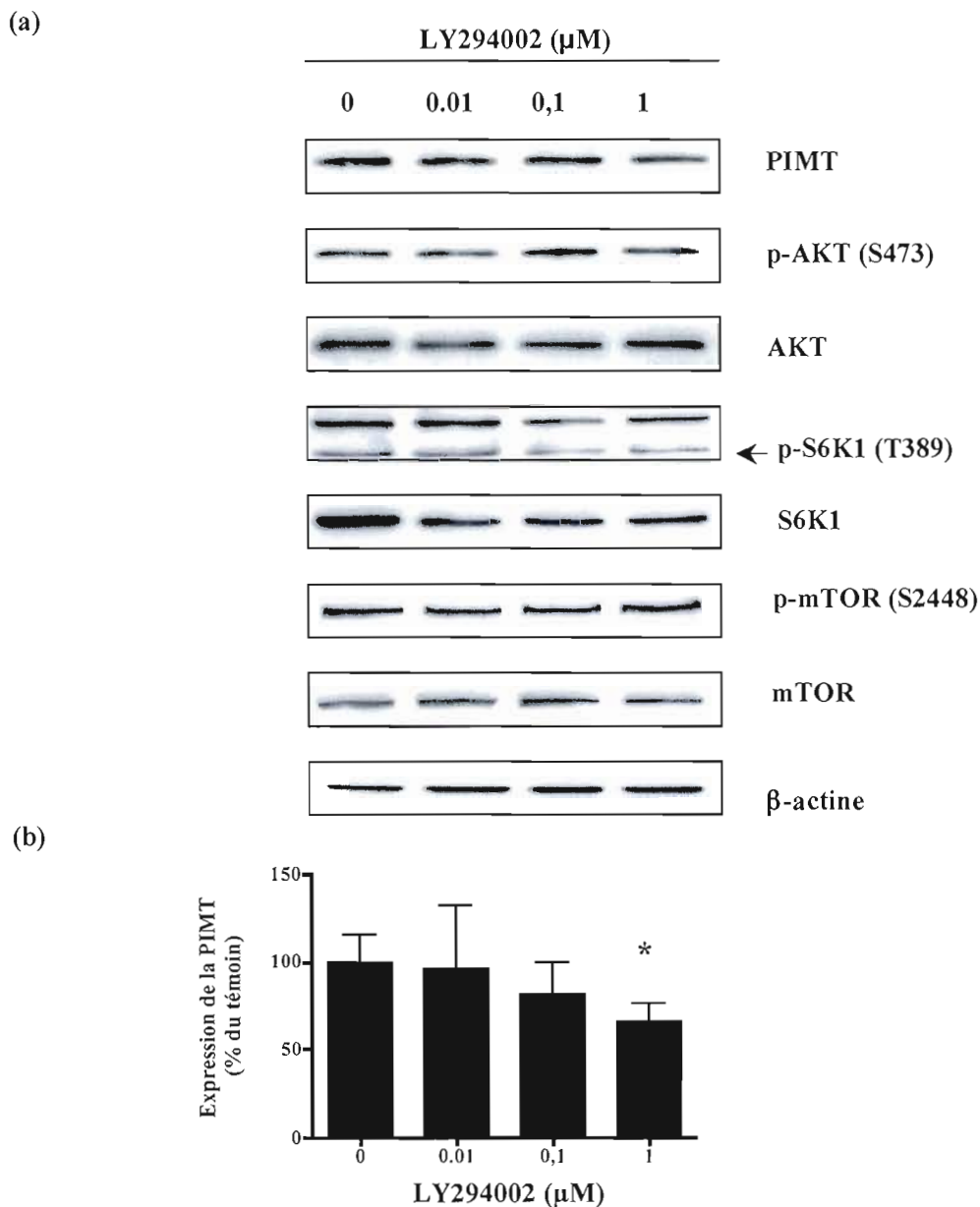


Figure 3.6 Effet du LY294002 sur l'expression de la PIMT. (a) Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures et traitées avec le LY294002 à 0.01, 0.1 et 1 μM pendant 20 min. Pour le témoin, les cellules ont été traitées avec du Me_2SO . Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : PIMT, phospho-AKT (p-AKT), AKT, phospho-S6K1 (p-S6K1), S6K1, phospho-mTOR (p-mTOR), mTOR et β -actine. (b) L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. L'astérisque (*) identifie les valeurs $p < 0.05$ qui sont significativement différentes par rapport au témoin.

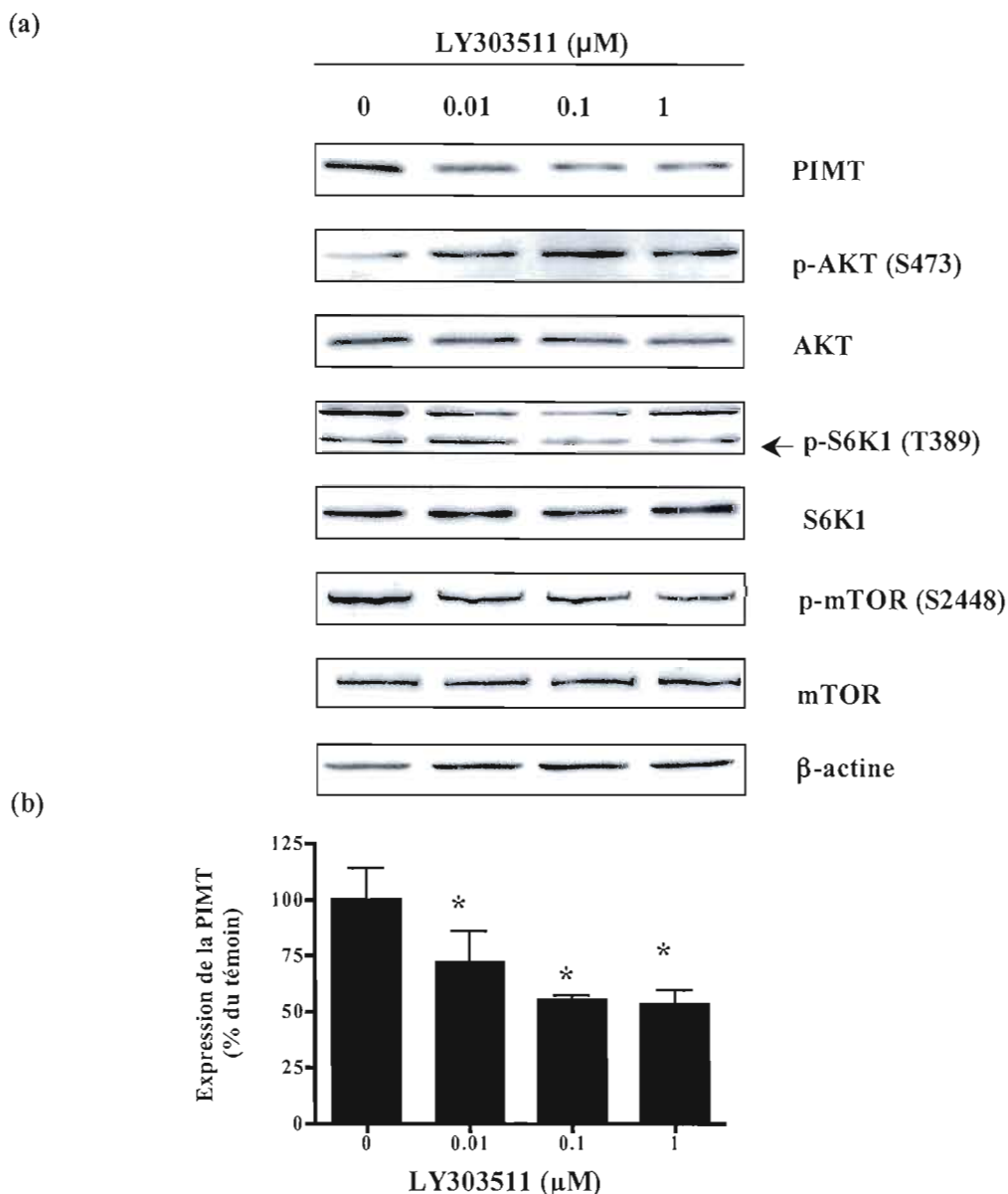


Figure 3.7 Effet du LY303511 sur l'expression de la PIMT. (a) Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures et traitées avec le LY303511 à 0.01, 0.1 et 1 μM pendant 20 min. Pour le témoin, les cellules ont été traitées avec du Me_2SO . Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : PIMT, phospho-AKT (p-AKT), AKT, phospho-S6K1 (p-S6K1), S6K1, phospho-mTOR (p-mTOR), mTOR et β -actine. (b) L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. L'astérisque (*) identifie les valeurs $p < 0.05$ qui sont significativement différentes par rapport au témoin.

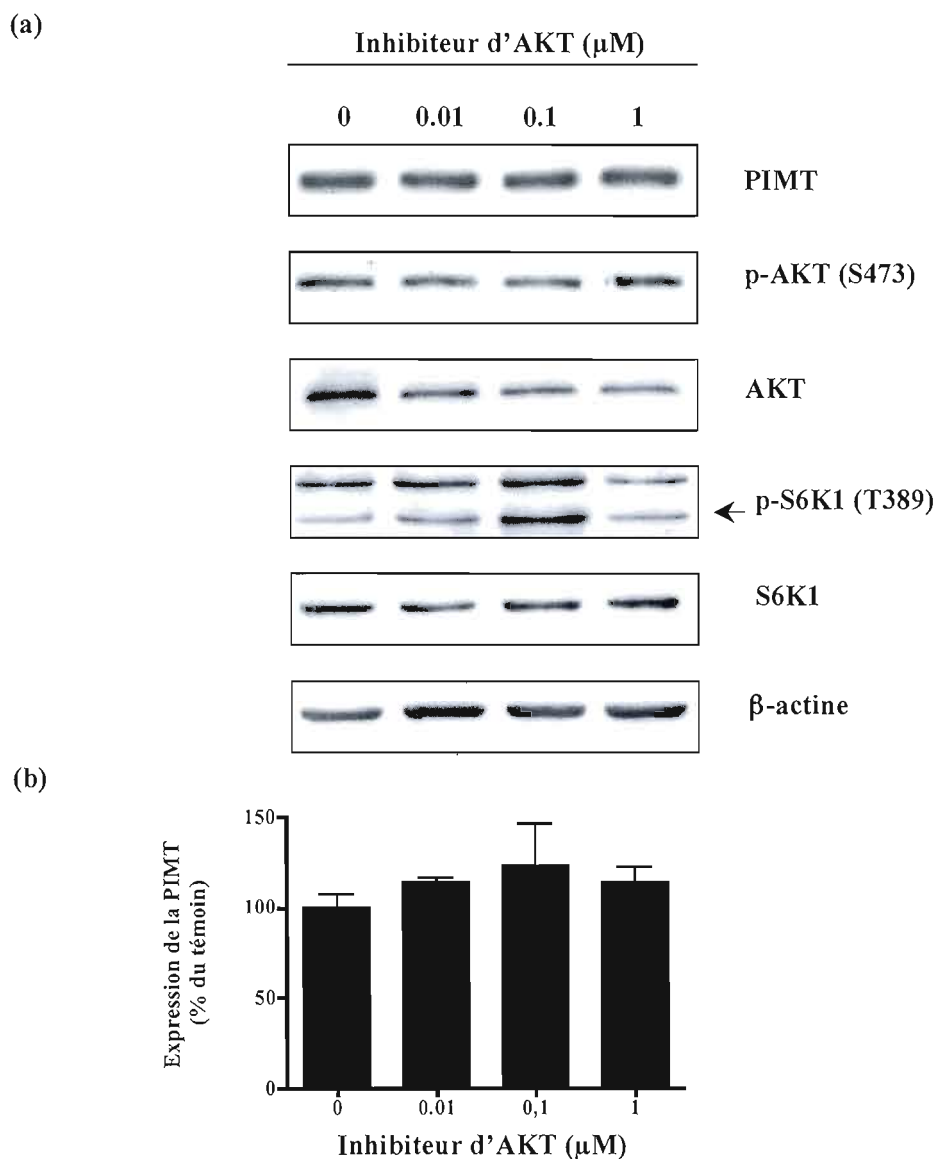


Figure 3.8 Effet de l'inhibiteur d'AKT sur l'expression de la PIMT. **(a)** Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures et traitées avec l'inhibiteur d'AKT à 0.01, 0.1 et 1 μM pendant 20 min. Pour le témoin, les cellules ont été traitées avec du Me_2SO . Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : PIMT, phospho-AKT (p-AKT), AKT, phospho-S6K1 (p-S6K1), S6K1 et β -actine. **(b)** L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes.

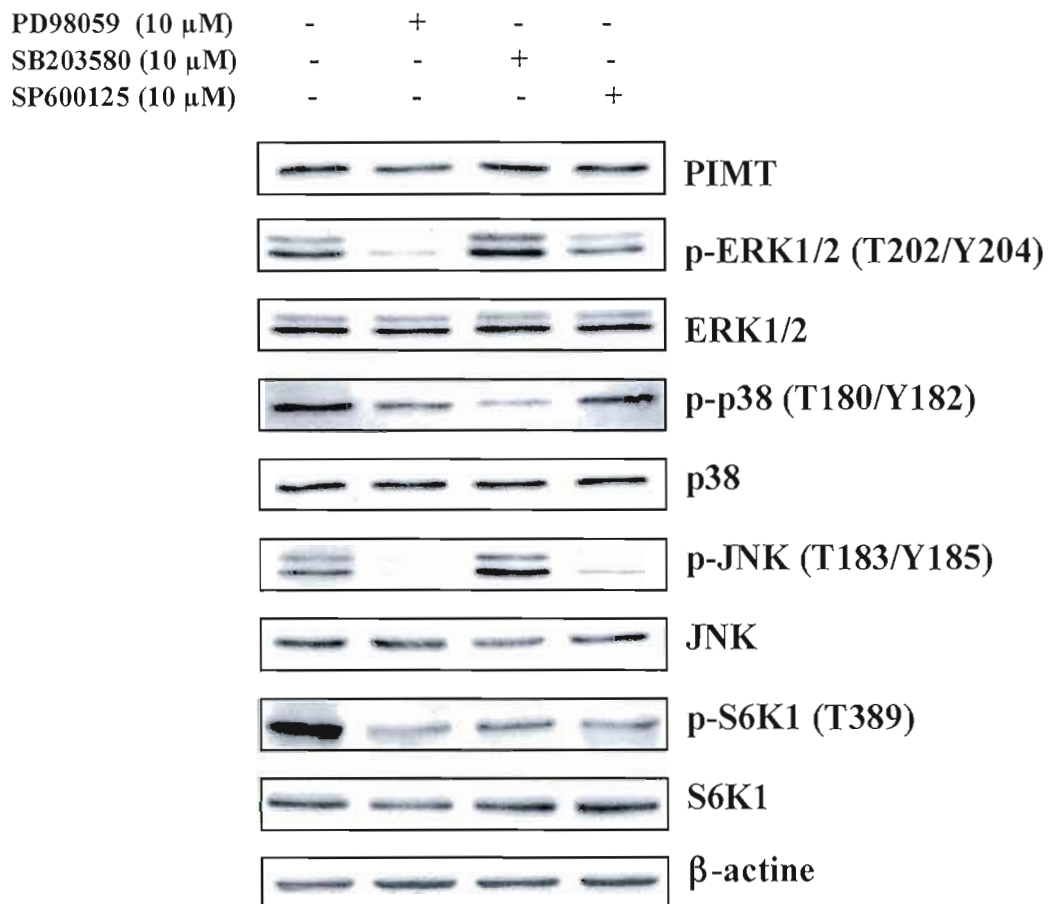


Figure 3.9 Effet des inhibiteurs des voies des MAP kinases sur l'expression de la PIMT. Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 48 heures et traitées avec 10 μ M de PD98059, de SB203580 et de SP600125 pendant 20 min. Pour les témoins, les cellules ont été traitées avec du Me₂SO. Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : PIMT, phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, phospho-p38 (p-p38), p38, phospho-JNK (p-JNK), JNK, phospho-pS6K1 (p-S6K1), S6K1 et β -actine. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

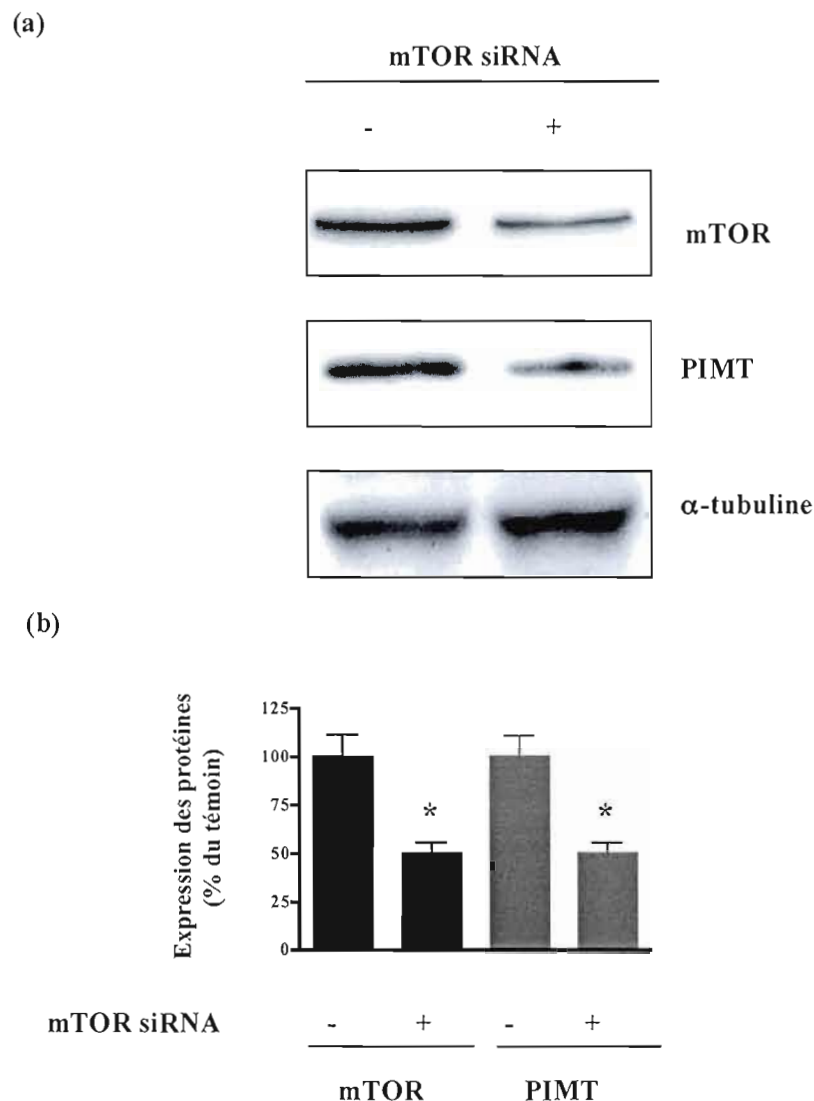


Figure 3.10 L'inhibition de l'expression de mTOR par siRNA entraîne une chute de l'expression de la PIMT. (a) Les cellules U87 ont été cultivées dans un milieu MEM contenant 10% de sérum pendant 24 heures puis transfectées avec un siRNA (100 nM) contre mTOR pendant 48 heures. Pour les témoins, les cellules ont été traitées avec l'agent de transfection seul (HiPerfect). Ensuite, les cellules ont été lysées, les protéines soumises à un immunobuvardage de type western et immunodétectées pour les protéines : mTOR, PIMT et α -tubuline. (b) L'analyse densitométrique de la PIMT est représentative de trois expériences indépendantes. L'astérisque (*) identifie les valeurs $p < 0.05$ qui sont significativement différentes par rapport au témoin.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La sérine/thréonine kinase mTOR est une protéine centrale pour les cellules. Elle contrôle la synthèse des protéines, la différenciation ainsi que la progression du cycle cellulaire. De plus, son activité est régulée par divers facteurs de croissance (insuline, VEGF) et nutriments (leucine, glutamine, glucose). Les différentes propriétés de mTOR ont fait en sorte qu'elle devienne une cible de la thérapie anticancéreuse. Cette thérapie repose sur la rapamycine et ses analogues qui sont des inhibiteurs spécifiques de mTOR. D'un autre côté, la PIMT est une enzyme impliquée dans la réparation des protéines. Elle est fortement exprimée dans le cerveau et pourrait jouer un rôle déterminant dans le développement des tumeurs cérébrales comme les glioblastomes (Lapointe *et al.* 2005). Par ailleurs, une étude soulève l'hypothèse que la PIMT jouerait un rôle dans la survie cellulaire (Huebscher *et al.* 1999).

Lorsque nous traitons *in vitro* les glioblastomes (U87) avec 0.02 μ M et 1 μ M de rapamycine en présence de sérum, on observe respectivement une chute de 40% et 70% de l'expression de la PIMT. Les concentrations de rapamycine utilisées sont reconnues pour inhiber que la kinase mTOR. De plus, 0.02 μ M de rapamycine est la concentration plasmatique des patients (Decker *et al.* 2003). Cela a été en plus confirmé par la chute de la phosphorylation de S6K1, une cible phosphorylée par mTOR. Par conséquent, les résultats montrent une corrélation entre l'inhibition de mTOR et celle de la PIMT. La composante sérum est importante dans le sens où il est connu que mTOR est activée par les facteurs de croissance du sérum. Dans diverses études, la kinase mTOR est préalablement activée par le sérum ou des facteurs de croissance avant un traitement avec la rapamycine. (Dennis *et al.* 2001; Riesterer *et al.* 2004; Visner *et al.* 2003). On suppose que le sérum assure l'intégrité fonctionnelle de mTOR et que cela entraîne un effet plus marqué de la rapamycine sur la PIMT comparativement à son effet en absence de sérum.

En plus des thérapies anticancéreuses, l'implication de la rapamycine en thérapie clinique est constatée à travers différentes études. Par exemple, il a été rapporté que la rapamycine atténue l'athérosclérose induite par un régime riche en cholestérol dans les souris déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (Castro *et al.* 2004). Par conséquent, en montrant que l'inhibition de mTOR par la rapamycine régule la PIMT, nous mettons en évidence l'implication clinique probable de la PIMT dans des divers processus physiologiques et physiopathologiques faisant intervenir une contribution de cette kinase.

Au cours de nos travaux, nous avons observé un paramètre expérimental très important. L'inhibition de l'expression de la PIMT par la rapamycine n'était reproductible qu'à un compte cellulaire de 50 000 cellules, soit à environ 70% de confluence. À une confluence cellulaire supérieure à 70%, la rapamycine n'entraînait plus une diminution de l'expression de la PIMT. Dans ces conditions, la réponse de la PIMT variait d'une expérience à l'autre. On observait que l'expression de la PIMT était induite par la rapamycine ou n'était pas modulée par la rapamycine. Nous expliquons cela en émettant l'hypothèse que la PIMT serait en même temps régulée par l'adhérence et l'interaction cellulaires. D'ailleurs, notre laboratoire a déjà montré que la PIMT était surexprimée lorsqu'on détachait les cellules U87 (Lanthier et Desrosiers, article soumis). Dans le même ordre d'idée, une équipe a montré que la réponse de la p53 variait en fonction de la confluence cellulaire. Principalement, elle a montré que l'induction de la p53 par le cis-platine était inhibée par une haute densité cellulaire (Bar *et al.* 2004). Par ailleurs, il a été rapporté que la réponse à la rapamycine était dépendante de p53 dans les cellules tumorales (Huang *et al.* 2001; Rowinsky, 2004). En effet, la rapamycine induit un arrêt du cycle cellulaire dépendant de mTOR dans les cellules tumorales exprimant le type sauvage du gène p53. Par contre, dans les cellules mutées pour le gène p53, la réponse est l'apoptose dépendante de mTOR. Ces réponses différentes sont dues au fait que mTOR inhibe la protéine ASK1 (*apoptosis-signal-regulating kinase 1*), une protéine sous le contrôle de p53 (Bjorntsi et Houghton, 2004). En somme, il serait intéressant de comparer les expressions de mTOR, de p53 et de ASK1 avec celle de la PIMT en fonction de la densité des cellules U87. Or, si la régulation de mTOR et celle de la PIMT dans les cellules U87 sont dépendantes de la confluence cellulaire, on peut avancer que l'expression de mTOR et celle de la PIMT seraient modulées au cours de la progression tumorale. Les

cellules U87 sont reconnues pour être très invasives et ce caractère invasif pourrait être influencé par l'adhérence et l'interaction de ces cellules. Alors, il est possible que le niveau d'expression de la PIMT joue sur la propriété invasive des cellules U87.

La rapamycine entraîne une diminution de l'expression de la PIMT sans toutefois moduler le niveau de son ARNm. Ceci indique que la régulation de la PIMT par mTOR serait au niveau de la protéine seulement. On a montré ce même phénomène dans l'étude sur l'épilepsie (Lanthier *et al.* 2002). Il aurait été tout de même surprenant d'observer une modulation de l'ARNm vu le traitement court (20 min) avec la rapamycine. Vu que mTOR contrôle l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe, il est possible que la diminution de l'expression de la PIMT soit due à l'arrêt de sa traduction. Cependant, une étude a rapporté que l'inhibition de mTOR entraînait l'arrêt de la traduction après plusieurs heures (Beretta *et al.* 1996). Alors, il y aurait deux possibilités qui expliqueraient la diminution rapide de la PIMT. Premièrement, la PIMT serait rapidement dégradée par une des deux voies de dégradation des protéines (protéasome et autophagie). En second lieu, un traitement à la rapamycine pourrait induire une relocalisation cellulaire de la PIMT. Cette dernière hypothèse vient du fait que seuls les lysats post-nucléaires ont été recueillis lors des expériences. Or, il est possible que la rapamycine entraîne une relocalisation de la PIMT du cytosol vers le noyau. Mais aucune étude ne fait état d'un processus de relocalisation cellulaire en présence de rapamycine. Par contre, des études ont montré que l'inhibition de mTOR entraînait la dégradation des protéines par le protéasome (Briaud *et al.* 2005; Riesterer *et al.* 2004). Puis, il a été montré que l'inhibition de mTOR induit l'autophagie dans un modèle de souris atteintes de la maladie d'Huntington (Ravikumar *et al.* 2004). Dans un premier temps, nous nous sommes orientés vers l'autophagie puisqu'une autre étude a montré que la rapamycine induisait l'autophagie dans les cellules U87 (Takeuchi *et al.* 2005). Nous avons des résultats préliminaires qui montrent que la PIMT est moins dégradée lors d'un traitement avec la rapamycine en présence de l'inhibiteur de l'autophagie, le 3-méthyladénine. Ceci n'exclut pas la possibilité que la PIMT soit dégradée aussi par le protéasome. La démonstration que la rapamycine induit l'autophagie et non l'apoptose dans les U87 nous pousse à critiquer le rôle anti-apoptotique attribué à la PIMT. Nos résultats soulèvent l'hypothèse que la PIMT n'est pas associée à l'apoptose, mais plutôt à la mort

cellulaire autophagique qui est d'ailleurs très étudiée aujourd'hui. Or, il existe des outils qui permettent de distinguer des cellules en processus de mort cellulaire autophagique (Gozuacik et Kimchi, 2004). Donc, il serait justifié d'évaluer l'expression et la localisation de la PIMT dans ces cellules.

Le fait que la rapamycine est avant tout un immunosuppresseur nous a conduits à traiter les cellules U87 avec deux autres immunosuppresseurs connus : le FK-506 et la cyclosporine A (CsA). Étonnamment, ces derniers diminuent aussi l'expression de la PIMT quoique à un moindre degré. Les immunosuppresseurs auraient donc l'effet de diminuer l'expression de la PIMT, mais seul l'immunosuppresseur rapamycine peut inhiber mTOR. En effet, il n'a pas encore été démontré que le FK-506 ou la CsA puissent agir sur mTOR, et ce, malgré des mécanismes d'action similaires de ces trois immunosuppresseurs. Ainsi, indépendamment de mTOR, d'autres mécanismes dépendants des immunosuppresseurs et qu'ils restent à explorer régulent l'expression de la PIMT. D'ailleurs, il a déjà été rapporté une production accrue d'auto-anticorps chez les souris déficientes pour la PIMT (Doyle, Gee et Mamula, 2003). Ultérieurement, il serait intéressant de vérifier s'il existe un lien entre les immunosuppresseurs et mTOR. Notre première piste serait l'étude des immunophilines, car les trois immunosuppresseurs lient tout d'abord une immunophiline avant d'inhiber leur cible protéique. De plus, la rapamycine et le FK-506 qui sont les deux meilleurs immunosuppresseurs bloquant l'expression de la PIMT lient la même immunophiline : le FKBP-12. Cette immunophiline commune pour la rapamycine et FK-506 soulève la possibilité que le FKBP-12 soit impliqué dans la régulation de l'expression de la PIMT. D'autre part, les immunophilines ont une activité peptidyl prolyl cis/trans isomérase impliquée dans le repliement des protéines (Voet et Voet, 2004). Donc, elles font partie d'une autre famille de protéines de réparation complémentaire à celle de la PIMT (Clarke, 2003).

Le lien entre les nutriments et la PIMT a déjà été constaté. Par exemple, on sait que le niveau d'acide folique chez le rat module l'activité de la PIMT (Ghandour *et al.* 2002). D'un autre côté, la kinase mTOR est régulée par les acides aminés, particulièrement les acides aminés branchés comme la glutamine et la leucine. Alors, nous avons montré qu'une

privation des cellules U87 en glutamine résultait en une réduction de l'expression de la PIMT. La privation en glutamine provoquait aussi une diminution de l'expression de mTOR, ce qui suppose que la PIMT est affectée par le niveau d'expression de mTOR. De plus, nos résultats indiquent que les mécanismes physiologiques qui régulent mTOR risquent de réguler la PIMT. Dans ce cas-ci, c'est la biodisponibilité en acides aminés. Bien que mTOR soit régulée par la glutamine, elle l'est à un niveau considérablement inférieur à la leucine. Une étude a montré que la privation en leucine conduisait à une chute de 80% de l'activité de la S6K1 comparativement à 20% après une privation en glutamine (Hidayat *et al.* 2003). Ce qu'il y a de particulier avec la leucine, c'est le fait qu'elle soit un acide aminé essentiel, contrairement à la glutamine. Comme nous avons montré que la PIMT diminuait après une privation en glutamine, il est fort possible qu'elle soit régulée de même par la leucine et les autres acides aminés essentiels. Donc, un régime alimentaire pauvre en protéines devrait moduler pareillement l'expression de mTOR et de la PIMT.

La voie PI3K/AKT/mTOR est caractérisée par l'interdépendance des kinases qui la constituent. Cependant, certains travaux ont rapporté que mTOR pourrait être régulée indépendamment de la PI3K. En particulier, ce phénomène a été observé dans trois études qui ont suscité notre intérêt (Choi *et al.* 2004; Kristof *et al.* 2005; Shergogue et Trojanowska, 2004). Globalement, ces études montrent comment la régulation par mTOR peut être indépendante de la PI3K. En ce qui concerne la PIMT, son expression est dépendante de mTOR, mais semble indépendante des protéines qui régulent mTOR en amont, en l'occurrence la PI3K et AKT. Nous sommes alors confrontés à un dilemme qui se traduit en ce sens : l'inhibition spécifique de mTOR diminue l'expression de la PIMT tandis que l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR ne module pas significativement l'expression de la PIMT. Même si la modulation à la hausse observée par le traitement avec la wortmannine (inhibiteur de la PI3K) n'est guère significative, nous observons tout de même une tendance. De plus, nous avons montré la spécificité de la régulation de la PIMT par mTOR avec un siRNA dirigé contre l'expression de mTOR. En effet, nous avons observé une inhibition de 50% de l'expression de mTOR par siRNA qui corrèle avec une chute de 50% de l'expression de la PIMT. Il y aurait donc un double mécanisme de régulation de la PIMT. Elle serait régulée à la baisse par l'inhibition de mTOR et serait potentiellement régulée à la hausse par

l'inhibition de la PI3K. Une façon de le prouver est l'utilisation d'un siRNA dirigé contre la PI3K. En fait, la PI3K et mTOR sont des kinases de la même famille qui agissent en cascade dans une même voie de signalisation. Cependant, une régulation différentielle de l'expression de la PIMT par ces deux kinases suggérerait l'existence d'une voie de signalisation autre qui impliquerait la PI3K mais serait indépendante de mTOR démontrant que la PIMT est finement régulée.

Nous avons montré que l'expression de la PIMT chute de 50% lorsqu'on inhibe l'expression de mTOR par siRNA. Ce résultat capital démontre que mTOR serait le principal régulateur de la PIMT. D'un autre côté, la kinase ERK1/2 est désormais connue pour activer indirectement mTOR. Or, nous avons montré que l'inhibition de ERK1/2 inhibe aussi l'expression de la PIMT. En somme, tous nos résultats montrent que la régulation de la PIMT passe par mTOR (fig. 4.1). Cependant, cela ne réfute pas la possibilité qu'une autre protéine puisse réguler l'expression de la PIMT. Jusque-là, nous nous sommes attardés aux voies de signalisation en amont de mTOR, mais qu'en est-il des protéines régulées par mTOR? La S6K1, par exemple, est régulée par mTOR, mais nos résultats montrent qu'il est peu probable que la S6K1 régule la PIMT. Ainsi, nous montrons que l'inhibition de la voie de PI3K et conséquemment de la phosphorylation de S6K1 par la wortmannine ne bloque pas l'expression de la PIMT. D'autre part, le LY303511 peut effectivement inhiber mTOR, mais il est aussi connu pour inhiber la protéine kinase CK2. Or, vu que nous avons montré que le LY303511 diminue la phosphorylation de mTOR, nous proposons l'existence qu'une kinase x qui phosphoryle mTOR (fig. 4.1). Logiquement, on a regardé la protéine CK2 comme candidat pour la kinase x. Pour cela, nous avons traité les cellules U87 avec un inhibiteur de CK2 plus spécifique que le LY303511 et reconnu, le DRB. Les résultats obtenus montrent que le DRB diminue fortement l'expression de la PIMT sans toutefois diminuer la phosphorylation de mTOR indiquant que CK2 n'est pas la kinase x inconnue régulée par le LY303511 (résultats non montrés). Cependant, ceci indique, qu'en plus de mTOR, la protéine kinase CK2 régule aussi la PIMT. Par ailleurs, il est fort possible que les kinases mTOR et CK2 possèdent une cible phosphorylée commune qui soit le réel régulateur de l'expression de la PIMT.

En montrant que la PIMT est régulée par mTOR, nous mettons en évidence l'implication de la PIMT dans le cancer. En perspective, il faudrait montrer par quel mécanisme la PIMT affecte les cellules cancéreuses. La kinase mTOR pourrait interagir avec la PIMT ou même phosphoryler la PIMT. Or, aucune expérience n'a exclu que la PIMT soit physiquement liée à d'autres protéines ou même phosphorylée par une kinase quelconque. Par ailleurs, la surexpression de mTOR dans certains cancers pourrait être associée à une surexpression de la PIMT. Cela renvoie à évaluer l'impact de la réparation des protéines dans les cellules cancéreuses.

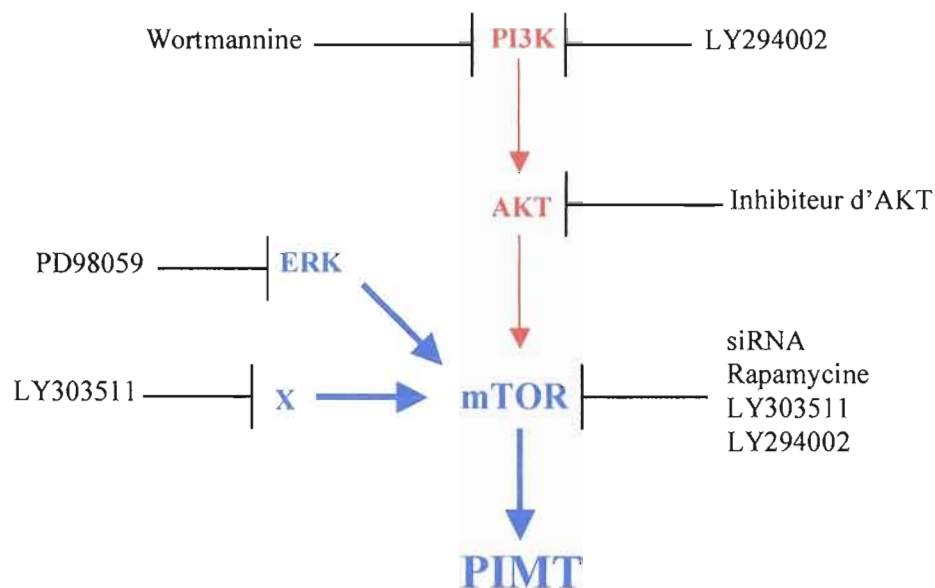


Figure 4.1 Schéma des voies de signalisation étudiées pour l'analyse des mécanismes de régulation de la PIMT. Les voies qui sont impliquées dans la régulation de la PIMT et qui sont dépendantes de mTOR sont représentées par la couleur bleue. Celles qui sont impliquées dans la régulation de la PIMT et qui semblent indépendantes de mTOR sont représentées par la couleur rouge. Les inhibiteurs sont représentés par les mots de couleur noire. Les droites avec une flèche indiquent une activation de l'expression de la PIMT. Les droites avec une barre indiquent une inhibition de l'expression de la PIMT à l'exception de la wortmannine et de l'inhibiteur d'AKT qui n'inhibent pas son expression.

CONCLUSION

La PIMT est une enzyme de réparation qui limite l'accumulation de résidus L-isoaspartates anormaux au niveau des protéines. La formation de résidus L-isoaspartates est un processus lié au vieillissement des protéines qui peut conduire à l'altération de leur fonction. Par conséquent, la PIMT prévient le vieillissement prématuré des protéines tout en assurant l'intégrité fonctionnelle de celles-ci. C'est une enzyme très bien conservée chez les archéobactéries, les eubactéries et les eucaryotes (Kagan *et al.* 1997). Nous pouvons supposer que la PIMT est apparue très tôt au cours de l'évolution. Dans le contexte d'autrefois, où l'espérance de vie humaine était courte mais où le stress environnemental était constant, la PIMT aurait joué un rôle essentiel. Dans le contexte actuel, quel est l'intérêt d'étudier la PIMT? Dans les sociétés industrialisées, l'espérance de vie est considérablement plus longue et la population est vieillissante. Il en découle que les maladies directement reliés au vieillissement prendront de l'ampleur. L'importance du mécanisme de réparation des protéines est constatée dans certaines maladies neurologiques qui résulteraient de la diminution de l'expression de la PIMT. Par exemple, notre laboratoire a montré que l'expression de la PIMT chute de 80% dans les glioblastomes (Lapointe *et al.* 2005). Les glioblastomes sont un type de tumeurs cérébrales qui affectent principalement les personnes âgées (45 à 60 ans). C'est aussi la tumeur cérébrale possédant le degré de malignité le plus élevé (Mörk et Wester, 1998). De ce fait, nous avons entrepris le projet d'analyser les voies de signalisation qui régulent la PIMT en utilisant les glioblastomes (U87) comme modèle cellulaire. C'est une démarche scientifique jamais entreprise dans l'étude de la PIMT. Or, nos efforts ont abouti à la démonstration que l'expression de la PIMT était dépendante de mTOR, une kinase clé dans la survie et la prolifération cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Adi, S., Wu, N.-Y. et Rosenthal, S.M. 2001. « Growth factors-stimulated phosphorylation of AKT and p70^{S6K} is differentially inhibited by LY294002 and Wortmannin ». *Endocrinology*, vol. 142, p. 498-501.
- Andrade, M.A. et Bork, P. 1995. « HEAT repeats in the huntington's disease protein ». *Nat. Genet.*, vol. 11, p. 115-116.
- Aswad, D.W. et Reissner, K.J. 2003. « Deamidation and isoaspartate formation in proteins :unwanted alterations or surreptitious signals? ». *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, p. 1281-1295.
- Aswad, D.W. (éd). 1995. « Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins » Chap. in *Purification and properties of protein L-isoaspartyl methyltransferase*, p. 31-46. Boca Raton (FL): CRC Press
- Aswad, D.W. 1984. « Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25 ». *J. Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10714-10721.
- Avruch, J., Belham, C., Weng, Q., Hara, K. et Yonezawa, W. 2001. « The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity ». *Pro. Mol. Subcell. Biol.*, vol. 26, p. 115-154.
- Axelrod, J. et Daly, J. 1965. « Pituitary gland : enzymatic formation of methanol from S-adenosylmethionine ». *Science*, vol. 150, p. 892-893.
- Axelrod, J. et Diliberto, E.J., Jr. 1974. « Charactrization and substrate specificity of a protein carboxymethylase in the pituitary gland ». *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 71, p. 1701-1704.
- Bar, J., Noyman-Cohen, E., Geiger, B. et Oren, M. 2004. « Attenuation of p53 response to DNA damage by high cell density ». *Oncogene*, vol. 23, p. 2128-2137.
- Beretta, L., Gingras, A.-C., Svitkin, Y.V., Hall, M.N. et Sonenberg, N. 1996. « Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation ». *EMBO. J.*, vol. 15, p. 658-664.

- Beugnet, A., Tee, A., Taylor, P.M. et Proud, C.G. 2003. « Regulation of targets of mTOR signalling by intracellular amino acid availability ». *Biochem. J.*, vol. 372, p. 555-566.
- Bjornsti, M-A. et Houghton, P.J. 2004. « The TOR pathway : a target for cancer therapy ». *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, p. 335-338.
- Boivin, D., Béliveau, R. et Gingras, D. 1993. « Purification and characterisation of a membrane-bound protein carboxyl methyltransferase from rat kidney cortex ». *J. Biol. Chem.*, vol. 268, p. 2610-2615.
- Bosotti, R. Isacchi, A. et Sonhammer, E.L. 2000. « FAT : a novel domain in PIK-related kinases ». *Trends Biochem. Sci.*, vol. 25, p. 225-227.
- Briaud, I., Dickson, L.M., Lingohr, M.K., McCuaig, J.F., Lawrence, J.C. et Rhodes, C.J. 2005. « Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in β -cells ». *J. Biol. Chem.*, vol. 280, p. 2282-2293.
- Brunn, G.J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J.C., Jr. et Abraham, R.T. 1996. « Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-Kinase inhibitors, wortmannin and LY294002 ». *EMBO. J.*, vol. 15, p. 5256-5267.
- Carpentier, A.F. 2005. « Nouvelles approches thérapeutiques des glioblastomes ». *Bull. Cancer*, vol. 92, p. 355-359.
- Castro, C., Campistol, J.M., Sancho, D., Sanchez-Madrid, F., Casals, E. et Andrés, V. 2004. « Rapamycin attenuates atherosclerosis induced by dietary cholesterol in apolipoprotein-deficient mice through a p27^{kip1}-independant pathway ». *Atherosclerosis*, vol. 172, p. 31-38.
- Chen, W., Ji, J. and Ru, B. 2005. « Proteomic analysis of corticobasal degeneration : a case study of corticobasal degeneration at the proteome level ». *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.*, vol. 17, p. 364-371.
- Choi, E.-K., Park, H.-J., Ma, J.-S., Lee, H.-C., Kang, H.-C., Kim, B.-G. et Kang, I.-C. 2004. « LY294002 inhibits monocyte chemottractant protein-1 expression through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism ». *FEBS Lett.*, vol. 559, p. 141-144.

- Clarcke, S. et Murray, E.D., Jr. 1984. « Synthetic peptide substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues ». *J. Biol. Chem.*, vol. 259, p. 10722-10732.
- Clarcke, S. 1985. « Protein carboxyl methyltransferases : two distinct classes of enzymes ». *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 54, p. 479-506.
- Clarcke, S. et Lowenson, J.D. 1992. « Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis ». *J. Biol. Chem.*, vol. 267, p. 5985-5995.
- Clarke, S. 2003. « Aging as war between chemical and biochemical processes : Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair ». *Ageing Res. Rev.*, vol. 2, p. 263-285.
- Codogno, P. et Meijer, A.J. 2005. « Autophagy and signaling : their role in cell survival and cell death ». *Cell Death and Differentiation.*, vol. 12, p. 1509-1518.
- Cuprak, L.J., Liss, M. et Maxam, A.M. 1969. « Methylation of protein by calf spleen methylase. A new protein methylation reaction ». *J. Biol. Chem.*, vol. 244, p. 1617-1622.
- David, C.L., Szumlanski, C.L., DeVry, C.G., Park-Hah, J.O., Clarke, S., Weinshilboum, R.M. et Aswad, D.W. 1997. « Human erythrocyte protein L-isoaspartatyl methyltransferase : heritability of basal activity and genetic polymorphism for thermal stability ». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 335, p. 321-332.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. et Cohen, P. 2000. « Specificity and mechanism of some commonly used protein kinase inhibitors ». *Biochem. J.*, vol. 351, p. 95-105.
- Decker, T., Hipp, S., Ringshausen, I., Bogner, C., Oelsner, M., Schneller, F. et Peschel, C. 2003. « Rapamycin-induced G₁ arrest in cycling B-CLL cell is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin ». *Blood*, vol. 101, p. 278-285.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C. et Thomas, G. 2001. « Mammalian TOR : a homeostatic ATP sensor ». *Science*, vol. 294, p. 1102-1105.

- DeVry, C.G. et Clarke, S. 1999. « Polymorphism forms of protein L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase involved in the repair of aged-damaged proteins ». *J. Hum. Genet.*, vol. 44, p. 275-288.
- Doyle, H.A., Gee, R.J. et Mamula, M.J. 2003. « A failure to repair self-proteins leads to T cell hyperproliferation and autoantibody production ». *J. Immunol.*, vol. 171, p. 2840-2847.
- Farrar, C., Houser, C.R. et Clarke, S. 2005. « Activation of PI3K/AKT signal transduction pathway and increased levels of insulin receptor in protein repair deficient mice ». *Aging Cell.*, vol. 4, p. 1-12
- Gao, N., Zhang, Z., Jiang, B.-H. et Shi, X. 2003. « Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 310, p. 1124-1132.
- Ghandour, H., Lin, B.-F., Choi, S.-W., Mason, J.B. et Selhub, J. 2002. « Folate status and age affect the accumulation of L-isoaspartyl residues in rat liver proteins ». *J. Nutr.*, vol. 132, p. 1357-1360.
- Gingras, D., Boivin, D., Bilodeau, D., Pelletier, J. et Béliveau, R. 1994. « Les protéines carboxyles méthyltransférases des eucaryotes : deux classes distinctes d'enzymes ». *médecine/sciences*, vol. 10, p. 55-64.
- Gozuacik, D. et Kimchi, A. 2004. « Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism ». *Oncogene*, vol. 23, p. 2891-2906.
- Guertin, D.A. et Sabatini, D.M. 2005. « An expanding role for mTOR in cancer ». *Trends Mol. Med.*, vol. 11, p. 353-361.
- Hay, N. et Sonenberg, N. 2004. « Upstream and downstream of mTOR ». *Genes & Dev.*, vol. 18, p. 1926-1945.
- Hidayat, S., Yoshino, K., Tokunaga, C., Hara, K., Matsuo, M. et Yonezawa, K. 2003. « Inhibition of amino acid-mTOR signaling by leucine derivative induces G1 arrest in Jurkat cells ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 301, p. 417-423.
- Houchens, D.P., Ovejera, A.A., Riblet, S.M. et Slagel, D.E. 1983. « Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model ». *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, vol. 19, p. 799-805.

- Huang, S. et Houghton, P.J. 2003. « Targeting mTOR signaling for cancer therapy ». *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 3, p. 371-377.
- Huang, S., Liu, L.N., Hosoi, H., Dilling, M.B., Shikata, T. et Houghton, P.J. 2001.
 . « p53/p21^{CIP1} cooperate in enforcing rapamycin-induced G1 arrest and determine the cellular response to rapamycin ». *Cancer Res.*, vol. 61, p. 3373-3381.
- Huebscher, K.J., Lee, J., Rovelli, G., Ludin, B., Matus, A., Stauffer, D. et Fürst, P. 1999.
 « Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis ». *Gene.*, vol. 240, p. 333-341.
- Jacinto, E. et Hall, M.N. 2003. « Tor signalling in bugs, brain and brawn ». *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 4, p. 117-126.
- Johnson, B.A., Langmark, E.L., et Aswad, D.W. 1987. « Partial repair or deamidation-damaged calmodulin by protein carboxyl methyltransferase ». *J. Biol. Chem.*, vol. 262, p. 12283-12287.
- Kim, S. et Paik, W.K. 1970. « Purification and properties of protein methylase II ». *J. Biol. Chem.*, vol. 245, p. 1806-1813.
- Kristof, A., Rodriguez-Pacheco, G., Schremmer, B. et Moss, J. 2005. « LY303511 (2-Piperazinyl-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) acts via phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathways to inhibit cell proliferation via mammalian target of rapamycin (mTOR)- and non-mTOR dependent mechanism ». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 314, p. 1134-1143.
- Laemmli, U.K. 1970. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». *Nature*, vol. 227, p. 680-685.
- Lanthier, J., Bouthillier, A., Lapointe, M., Demeule, M., Beliveau, R. et Desrosiers, R.R. 2002. « Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin ». *J. Neurochem.*, vol. 83, p. 581-591.
- Lanthier, J. et Desrosiers, R.R. 2004. « Protein L-isoaspartyl methyltransferase repairs abnormal aspartyl residues accumulated in vivo in type-I collagen and restores cell migration ». *Exp. Cell Res.* vol. 293, p. 96-105.

- Lapointe, M., Lanthier, J., Mouldjian, R., Régina, A. et Desrosiers, R.R. 2005. « Expression and activity of L-isoaspartyl methyltransferase decrease in stage progression of human astrocytic tumors ». *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 135, p. 93-103.
- Law, B.K. 2005. « Rapamycin : An anti-cancer immunosuppressant? ». *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 56, p. 47-60.
- Lehman, J.A. et Cambronero-Gomez, J. 2002. « Molecular cross talk between p70S6k and MAPK cell signaling pathways ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 293, p. 463-469.
- Luan, F.L., Hojo, M., Maluccio, M., Yamaji, K. et Suthathiran, M. 2002. « Rapamycin blocks tumor progression : unlinking immunosuppression from antitumor efficacy ». *Transplantation*, vol. 73, p. 1565-1572
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K. and Avruch, J. 2005. « Rheb binds and regulates the mTOR kinase ». *Curr. Biol.*, vol. 15, p. 702-713.
- Meijer, A.J. et Codogno, P. 2004. « Regulation and role of autophagy in mammalian cells ». *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, vol. 36, p. 2445-2462.
- Mizobuchi, M., Murao, K., Kakimoto, Y. et Takeda, R. 1994. « Tissue-specific expression of isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase gene in rat brain and testis ». *J. Neurochem.*, vol. 62, p. 322-328.
- Mörk, S. et Wester, K. 1998. « Malignant gliomas : histological features, invasion, and relation to clinical symptoms ». In *Brain tumor invasion : biological, clinical and therapeutic considerations*, sous la dir. de Mikkelsen T., Bjerkvig, R., Laerum, O.D. et Rosenblum, M.L. (éd), p. 89-110. New York : Wiley-Liss.
- Peng, T., Golub, T.R. et Sabatini, D.M. 2002. « The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation ». *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, p. 5575-5584.
- Proud, C.G. 2004. « The multifaceted role of mTOR in cellular stress responses ». *DNA Repair*, vol. 3, p. 927-934.

- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J. et Rubinsztein, D.C. 2004. « Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease ». *Nat. Genet.*, vol. 36, p. 585-595.
- Riesterer, O., Zingg, D., Hummerjohann, J., Bodis, S. et Pruschy, M. 2004. « Degradation of PKB/Akt protein by inhibition of the VEGF receptor/mTOR pathways in endothelial cells ». *Oncogene*, vol. 23, p. 4624-4635.
- Robinson, A.B. et Robinson, N.E. 2004. *Molecular Clocks : deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in peptides and proteins*. U.S.A. : Althouse Press, 419 p.
- Rowinsky, E.K. 2004. « Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR) ». *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 16, p. 564-575.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Bromage-Erdjument, E., Tempst, P. et Sabatini, D.M. 2004. « Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton ». *Curr. Biol.*, vol. 14, p. 1296-1302.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M. et Sabatini, D.M. 2005. « Growing roles for mTOR pathway ». *Curr. Opin. Cell. Biol.*, vol. 17, p. 1-8.
- Schowen, R.L. et Xie, M. 1999. « Secondary structure and protein deamidation ». *J. Pharm. Sci.* vol. 88, p. 8-13.
- Seglen, P.O. et Gordon, P. B. 1982. « 3-Methyladenine : Specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes ». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, p. 1889-1892.
- Shergogue, D. et Trojanowska, M. 2004. « Mammalian target of rapamycin positively regulates collagen type I production via a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway ». *J. Biol. Chem.*, vol. 279, p. 23166-23175.
- Shirasawa, T., Endoh, R., Zeng, Y.X., Sakamoto, K. et Mori, H. 1995. « Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat ». *Neurosci. Lett.*, vol. 188, p. 37-40.

- Smith, C.G., Carson, M., Friedman, A.M., Skinner, M.W., Delucas, L., Chantalat, L., Weise, L., Shirasawa, T. et Chattopadhyay, D. 2002. « Crystal structure of human L- isoaspartyl-O-méthyltransferase with S-adenosyl homocysteine at 1.6 Å resolution and modeling of an isoaspartyl-containing peptide at the active site ». *Protein Sci.*, vol. 11, p. 625-635.
- Takahashi, T., Hara, K., Inoue, H., Kawa, Y., Tokunaga, C., Hidayat, S., Yoshino, K., Kuroda, Y. et Yonezawa, K. 2000. « Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro ». *Genes Cells*, vol. 5, p. 765-775.
- Takeushi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B. et Kondo, S. 2005. « Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors ». *Cancer Res.*, vol. 65, p. 3336-3346.
- Visner, G.A., Lu, F., Zhou, H., Liu, J., Kazemfar, K. et Agarwal, A. 2003. « Rapamycin induces heme oxygenase-1 in human pulmonary vascular cells ». *Circulation*, vol. 107, p. 911-916.
- Voet, D., et Voet, J.G. 2004. *Biochemistry*. 3^{ième} éd. Hoboken (NJ) : Wiley, 1591 p.
- Vogt, P.K. 2001. « PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer ». *Trends Mol. Med.*, vol. 7, p. 482-484.
- Zhu, H., Yang, W., Lu, W., Zhang, J., Shaw, G.M., Lammer, E.J. et Finnell, R.H. 2006. « A known functional polymorphism (Ile120Val) of human PCMT1 gene and risk of spina bifida ». *Mol. Genet. Metab.*, vol. 87, p. 66-70.
- Xu, Q., Belcastro, M.P., Villa, S.T., Dinkins, R.D., Clarke, S.G. et Downie, A.B. 2004. « A second protein L-isopaspartyl methyltransferase gene in arabidopsis produces two transcripts whose products are sequestered in the nucleus ». *Plant Physiol.*, vol. 136, p. 1-13.
- Yamamoto, A., Takagi, H., Kitamaru, D. et al. 1998. « Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy ». *J. Neurosci.*, vol. 18, p. 2063-2074.